

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN  
GENÉTICA PARA EL ESTUDIO  
DE LA PATOGÉNESIS DE LA  
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

ANA MARTÍNEZ GARCÍA

2007





---

MEMORIA PRESENTADA POR LA LICENCIADA  
ANA MARTÍNEZ GARCÍA  
para aspirar al grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA MOLECULAR)

Directores de esta Tesis:

Dr. MARÍA JESÚS BULLIDO GÓMEZ-HERAS

Profesora Contratada UAM

y

Dr. FERNANDO VALDIVIESO AMATE

Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular

Madrid, Noviembre 2007

---



---

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular / Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC - UAM) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, con la financiación de la “Red de Centros de Genética Clínica y Molecular” de la Comunidad Autónoma de Madrid y de la Obra Social de Caja de Madrid / AFAL.





---

A Óscar  
A Osquitar

---



---

## AGRADECIMIENTOS

Antes de nada quisiera agradecer a todas las personas que de un modo u otro me han ayudado a conseguir que este trabajo salga adelante. Estas cosas no se me dan muy bien, y seguro que me dejo a alguien "en el tintero" que espero que me perdone...

En primer lugar, gracias a Fernando, por dejarme trastear en su laboratorio y por tener siempre ese ánimo tan contagioso por sacar las cosas adelante. Gracias M<sup>a</sup> Je (¿María J. o M<sup>a</sup> Jesús?, nunca lo pongo bien...) por enseñarme a trabajar, por esas tertulias para desconectar de vuelta a Colme, por ayudarme en tantas cosas...

A mis compañeros del laboratorio: a Isabel, por tu empeño en que sea organizada, que aunque no tengo yo muy claro que lo hayas logrado, que conste aquí que lo has intentado, a Mary, por ser tan maja, a las Grec... perdón, Teresa y Sori, por amenizarnos esas tardes de verano, a Junior y Diego, por ese humor tan especial, a Jesús, mil gracias por ese cable cuando ya iba a tirar la toalla, y a Loreto, por ayudarme con esos temas burocráticos que se me dan tan mal. También a los que ya no andan por aquí: Christian, Mamen, Raquel, Mari Carmen, Elena, Marta, Jorge, Carlitos, Juan, Javi,... también habéis aportado algo (o muchos algos) a este trabajo.

A las Malenis y a los Cecis, por ser tan buenos vecinos y dejarnos esa tacita de sal que nos hizo falta alguna vez, o por acogerme hasta que llegara alguien cuando olvidé las llaves...

También es de agradecer la labor de los compañeros del centro que nos hacen la vida un poco más fácil: Mada y Juan (por responder siempre amablemente a todas mis preguntas, que han sido muchas), Fernando Carrasco y cía, las chicas de compras, los servicios informáticos, de cocina, mantenimiento, instrumentación,...

Como olvidarme ahora de esas personas que me ayudan a desconectar fuera del labo: Arantxa y Jozeeeee, Nuria y Elo(ino), por esas fiestas, con y sin niños que hacen que los lunes lo sean aún más, con toda una semana por delante, pero con ilusión y ganas de liar otra... A Ara y M<sup>a</sup> Ví, Alma y Belén, que aunque esté mucho tiempo sin dar señales de vida, ico como olvidarme ahora de vosotras!, me habéis ayudado mucho más de lo que os podáis imaginar. A Ana Isabel, que empezamos juntas en esto de la ciencia y, aunque luego fuimos por caminos algo separados (menos mal, si no, qué hubiera sido de nosotras), sé que siempre puedo contar contigo.

A mis colegas de dar la nota, por no entender nada de lo que yo hago aquí, aparte de entretenerme todo el día con tubitos, pero hacer como que sí os interesa cuando os cuento algún avance. Por aguantar mis chistes malos y mi incontinencia verbal, de verdad que es un problema médico. A Ángel, por tus consejos, también los musicales, claro.

Muchísimas gracias a mis padres, que me habéis apoyado siempre y me habéis ayudado a llegar hasta aquí. A mis hermanos, que, aunque tampoco haya sabido explicaros muy exactamente en que consiste mi trabajo, de vez en cuando hacéis como que sí os interesa y como que hasta mola.... A Antonio y Carmen, que siempre me habéis ayudado, cuando me ha hecho falta y, cuando no, pues también.

Y, sobre todo, a mi pequeña gran familia: Óscar, porque esta tesis también es tuya, también la has vivido desde el principio, en los buenos momentos y en los peores, y siempre has tenido una palabra, y mucho más, de ánimo, aunque no termines de entender que tenga que pasar aquí tantas horas, y Osqui, mi nene, por ser lo más bonito del mundo. Especialmente a vosotros, porque me ayudáis a seguir adelante, y porque cada momento a vuestro lado es el mejor.

---





---

## ABREVIATURAS

---



**ABREVIATURAS**

$\beta$ -gal .....	$\beta$ -galactosidasa
A.....	Adenina
A $\beta$ .....	$\beta$ -Amiloide
APOE.....	Gen de la Apolipoproteína E
ApoE $\epsilon$ 4 .....	Alelo 4 del gen de la Apolipoproteína E
ApoE4 .....	Isoforma 4 de la Apolipoproteína E
APP.....	Proteína Precursora del Amiloide
C.....	Citosina
C/EBP .....	CCAAT/Potenciador de la Unión a Proteínas
Chop.....	Proteína Homóloga a C/EBP
DDIT3.....	Tránsito 3 Inducible por daño en el ADN, gen de Chop
EA .....	Enfermedad de Alzheimer
EO .....	Estrés Oxidativo
ERE .....	Estrés de Retículo Endoplásmico
G .....	Guanina
HSV-1 .....	<i>Herpes Simplex Virus</i> tipo 1
IC (95%) .....	Intervalos de Confianza al 95%
OR.....	Riesgo Relativo ( <i>Odds Ratio</i> )
PCR.....	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PSEN1 .....	Gen de la Presenilina 1
PSEN2 .....	Gen de la Presenilina 2
RE .....	Retículo Endoplásmico
RIE .....	Respuesta Integrada a Estrés
SNP.....	Polimorfismo de Base Única
T .....	Timina

---



---

## ÍNDICE

---



## ÍNDICE

<b>1. SUMMARY.....</b>	<b>23</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>27</b>
2.1. Enfermedad de Alzheimer.....	29
2.1.1. Enfermedad de Alzheimer Familiar .....	31
2.1.2. Enfermedad de Alzheimer Esporádica .....	33
2.1.2.1. Factores de riesgo no genéticos.....	33
2.1.2.2. Factores de riesgo genéticos .....	34
2.2. Mecanismos patogénicos de la Enfermedad de Alzheimer.....	36
2.2.1. Estrés Oxidativo .....	36
2.2.2. Estrés de Retículo Endoplásmico.....	37
2.2.3. Respuesta Integrada a Estrés.....	38
2.3. Análisis de Asociación.....	39
2.3.1. Genes de susceptibilidad .....	40
2.3.2. Estudio funcional de polimorfismos .....	44
2.3.2.1. <i>DDIT3</i> .....	44
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>47</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
4.1. Reactivos.....	53
4.2. Muestras humanas: pacientes y controles .....	53
4.2.1. Muestra de España - Centro .....	53
4.2.2. Muestra de España - Cataluña .....	54
4.2.3. Muestra de Canadá.....	54
4.3. Búsqueda y estudio de SNPs de interés .....	55

---

4.4. Análisis de genotipos.....	58
4.4.1. Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP).....	58
4.4.2. Transferencia de Energía Fluorescente por Resonancia (FRET).....	58
4.4.3. Sondas de Hidrólisis (TaqMan®).....	61
4.5. Plásmidos y clonajes.....	62
4.5.1. Clonaje de la región promotora del gen <i>DDIT3</i> en un vector .....	62
4.5.2. Generación del alelo 2 mediante mutagénesis dirigida .....	64
4.6. Líneas celulares .....	64
4.7. Transfección de células y medida de la actividad transcripcional.....	65
4.7.1. Transfección transitoria con las construcciones pXP2 - <i>DDIT3</i> .....	65
4.7.2. Transfección estable con las construcciones pXP2 - <i>DDIT3</i> .....	66
4.8. Tratamientos celulares.....	66
4.9. Análisis estadísticos .....	67
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>69</b>
5.1. Asociación genética.....	71
5.2. Funcionalidad de las variantes alélicas.....	94
5.2.1. Obtención de las construcciones plasmídicas empleadas.....	94
5.2.2. Obtención de dos líneas celulares que expresan de forma estable la proteína luciferasa bajo el control del promotor de <i>DDIT3</i> .....	94
5.2.3. Estudio de la actividad transcripcional del promotor de <i>DDIT3</i> .....	95
5.2.3.1. En células transfectadas transitoriamente .....	95
5.2.3.2. En células transfectadas establemente .....	98
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>103</b>
6.1. Asociación genética.....	105
6.2. Consecuencias funcionales de las variantes alélicas del promotor de <i>DDIT3</i> .....	113
6.3. Hipótesis sobre el papel del polimorfismo del promotor del gen <i>DDIT3</i> sobre la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer .....	115

---



<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>117</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>123</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>137</b>
9.1 Anexo I. Tabla de distribuciones genotípicas en las muestras analizadas.....	139
9.2. Anexo II. Copia de los artículos relacionados con la Tesis Doctoral .....	163
<i>A. Enfermedad de Alzheimer. Genes y mecanismos moleculares.....</i>	<i>165</i>
<i>B. SNP genotyping with FRET probes. Optimizing the resolution of         heterozygotes .....</i>	<i>179</i>
<i>C. Association of DSC1, a gene modulated by adrenergic stimulation, with         Alzheimer's disease .....</i>	<i>185</i>
<i>D. A TAP2 genotype associated with Alzheimer's disease in ApoE4 carriers.....</i>	<i>193</i>
<i>E. Double stranded RNA activated EIF2 <math>\alpha</math> kinase (EIF2AK2; PKR) is         associated with Alzheimer's disease .....</i>	<i>201</i>
9.2 Anexo III. Contenido en formato CD - ROM	



---

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

---



**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>M1.</b> Lista de SNPs estudiados.....	56
<b>R1.</b> Lista de SNPs analizados y asociación observada .....	92
<b>R2.</b> Análisis de los clones transfectados establemente con las construcciones en pXP2 <i>DDIT3</i> (-1507C) - Luciferasa y <i>DDIT3</i> (-1507G) - Luciferasa.....	95
<b>R3.</b> Activación del promotor <i>DDIT3</i> por Estrés Oxidativo (EO), Estrés de Retículo Endoplásmico (ERE) y su combinación (RIE) .....	101
<b>Anexo 1.</b> Distribuciones alélicas y genotípicas de los SNPs analizados en las diferentes muestras .....	141

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>I1.</b> Fotografía de una placa neurítica y de ovillos neurofibrilares .....	30
<b>I2.</b> Procesamiento del APP.....	31
<b>I3.</b> Esquema de la señalización génica en la Respuesta Integrada a Estrés.....	39
<b>M1.</b> Figura teórica de los genotipos observados con la técnica de sondas FRET ....	59
<b>M2.</b> Representación teórica del funcionamiento de las sondas TaqMan® .....	61
<b>M3.</b> Representación de un análisis de genotipado mediante sondas TaqMan® .....	62
<b>R1.</b> Representación en curvas de Cox de la edad de aparición de los síntomas de EA en función del genotipo del SNP rs2254958 .....	73
<b>R2.</b> Edad media de aparición de los síntomas de EA en las distintas muestras en función del genotipo del SNP rs3847699 .....	81
<b>R3.</b> Edad media de aparición de los síntomas de EA en las distintas muestras en función del genotipo del SNP rs11117269 .....	83
<b>R4.</b> Representación en curvas de Cox de la edad de aparición de los síntomas de EA en función del genotipo del SNP rs3025786 .....	88
<b>R5.</b> Actividad transcripcional del promotor de <i>DDIT3</i> en líneas transfectadas transitoriamente con las construcciones <i>DDIT3</i> (C-1507G) - Luciferasa.....	97
<b>R6.</b> Actividad transcripcional del promotor de <i>DDIT3</i> en líneas transfectadas establemente con las construcciones <i>DDIT3</i> (C-1507G) - Luciferasa.....	100

---



---

## SUMMARY

---





## 1. SUMMARY

Sporadic Alzheimer's Disease (AD) is a multifactorial trait of elderly resulting from combinations of genes and environmental factors. Neither environmental nor genetic factors causes the disease, but both are necessary but not sufficient for the development of the disease.

Our aim is to find novel genes modulating AD risk and/or important in the pathogenesis processes underlying the disease, which constitute potential therapeutic targets.

Previously at our laboratory, we have analyzed gene expression of neuronal cell models mimicking several aspects of AD pathogenesis and we have selected the most responder genes or altered functions. Polymorphisms at these genes are analyzed by association studies in case - control samples, which are a valuable tool for identifying genes contributing to the disease. If the pathogenesis process mimicked in the model is actually involved in the pathogenesis, allelic variants could modulate susceptibility to AD.

The models developed at the laboratory mimicks APP-overexpression, adrenergic, oxidative, endoplasmic reticulum stress and convergence of oxidative and endoplasmic reticulum stress simultaneously (this condition generates the Integrated Stress Response, ISR). In addition, we have studied related human genes with the infection by *Herpes Simplex Virus* type I (HSV-1).

By this strategy, we have identified several genes among the most regulated in the human neuroblastoma SK-N-MC as a response to the stresses, that are associated with AD, supporting the hypothesis that the mentioned processes are really involved in the pathogenesis of the disease. Also, all the HSV-1-related genes studied shown association with AD, suggesting that infection by this virus may be an important AD pathogenic process.

In addition, we have carried out the functional analysis of a biallelic polymorphism located in the promoter region of *DDIT3*, a gene that stimulates with ISR to conduct cells to apoptosis. We have observed that the promoter response to oxidative and endoplasmic reticulum stress differs from one allele to the other one, suggesting that allelic variants altering neuron responsiveness to stress could be important to modulate susceptibility to AD. This observation was also supported by the finding that this polymorphism modulates the risk and the age of onset of Alzheimer's disease.



---

# INTRODUCCIÓN

---



## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Enfermedad de Alzheimer

En Noviembre de 1901, Alois Alzheimer describió en detalle los síntomas y el progreso de degeneración mental en una mujer (Augusta D.), de 51 años de edad, que era paciente suya en el Hospital de Frankfurt. Los síntomas de la paciente incluían alteraciones cognitivas, desorientación, afasia, alucinaciones y comportamiento impredecible. La mujer murió en Abril de 1906 y en la autopsia el examen anatomopatológico reveló atrofia cerebral global y cambios característicos en sus estructuras internas, tales como “parches” (placas neuríticas) y “nudos de fibras” (*tangles* u ovillos neurofibrilares), fundamentalmente en las neuronas corticales. Después de la muerte de la paciente, el doctor Alzheimer expuso un resumen del caso en la conferencia de Psiquiatría en Tübingen, Alemania, el día 3 de Noviembre de 1906, titulando su exposición “Sobre un proceso peculiar de enfermedad de la corteza cerebral” (*Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde*). En 1910, Kraepelin sugirió para esta enfermedad el término de “Enfermedad de Alzheimer” (EA) (Moller y cols. 1998).

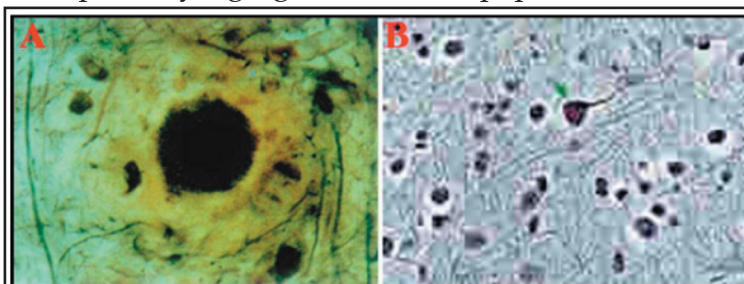
Hoy en día, con el término demencia se identifica un síndrome caracterizado por deterioro intelectual en adultos que es suficientemente grave como para interferir en las relaciones sociales (es importante diferenciar la demencia de las pequeñas pérdidas de memoria que se dan durante el envejecimiento normal). Los cambios cognitivos incluyen no sólo fallos de memoria, sino también en otras áreas cognitivas, como en el uso del lenguaje, percepción, praxis, capacidad para llevar a cabo actividades de la vida cotidiana, resolver problemas, pensar de manera abstracta y realizar juicios, entre otras cosas. Pueden darse episodios paranoides, y también irritabilidad, inquietud e incluso agresiones verbales y/o físicas a otras personas, normalmente del ambiente familiar, especialmente cuando la demencia avanza y el paciente nota una creciente pérdida de control sobre su entorno (Katzman 1986).

El aumento en la esperanza de vida que se ha dado en el siglo XX ha provocado que cada vez haya un número mayor de personas que alcanzan la edad en la que las enfermedades neurodegenerativas son más comunes. La EA es la más frecuente de las enfermedades neurológicas causantes de demencia que se dan fundamentalmente en las edades avanzadas, mostrándose en un 50 - 60% de todos los casos (Selkoe 2001; Blennow y cols. 2006). En el mundo, su prevalencia es de aproximadamente un 1% en la población de 60 a 64 años y se dobla cada 4 ó 5 años hasta llegar a un tercio de la población mayor de 80 años y la mitad de la población de 95 o más años (Fratiglioni y cols. 1999; Nestor y cols. 2004)

Clínicamente produce los síntomas ya descritos por el Dr. Alzheimer y patológicamente se caracteriza por las lesiones también descritas en la autopsia de la primera paciente de la enfermedad: las placas neuríticas y los ovillos neurofibrilares, que, aunque son comunes en el proceso normal del envejecimiento, son considerablemente menos numerosas y están menos distribuidas en cerebros de individuos clínicamente normales que en los de individuos con

EA, y aún hoy en día continúan siendo la marca característica de la enfermedad (London y cols. 1997; Goedert y cols. 2006). Como hay otras causas de pérdida de memoria, el diagnóstico definitivo de EA requiere un examen *post-mortem* del cerebro que revele un número suficiente de placas y ovillos que permitan calificar a ese cerebro como afectado por EA. Las regiones cerebrales con numerosas placas y ovillos presentan pérdida de sinapsis y muerte neuronal, y, como resultado de esto, se puede observar una reducción en el tamaño del cerebro; este efecto se observa fundamentalmente en las regiones implicadas en control del comportamiento emocional y en procesos de aprendizaje y memoria, como son los lóbulos frontal y temporal (Mattson 2004).

En cuanto a estas lesiones características de la EA, las placas neuríticas son lesiones extracelulares que se producen por el depósito y agregación de un péptido de 40 a 43 aminoácidos, denominado péptido  $\beta$ -amiloide o péptido A $\beta$  (Glenner y cols. 1984), que se produce por el procesamiento amiloidogénico de la Proteína Precursora del Amiloide (APP) y los ovillos neurofibrilares son lesiones intracelulares en los que la proteína asociada al citoesqueleto, Tau, se encuentra hiperfosforilada y, debido a esto, plegada de un modo anómalo (Morishima-Kawashima y cols. 2002). Ver Figura I1.



**Figura I1.** Fotografía de una placa neurítica (A) y de ovillos neurofibrilares (B).

Se pueden diferenciar dos formas de la enfermedad en función de su forma de herencia y de la edad de aparición de los síntomas (*onset*). Así, se habla de EA familiar o monogénica cuando se puede observar una herencia autosómica dominante con penetrancia prácticamente del 100% y se habla de EA esporádica o “no genética” cuando no es posible encontrar ningún patrón de herencia mendeliano, lo que indica que se trata de una enfermedad de naturaleza multifactorial en cuya patogénesis influyen tanto factores genéticos como factores ambientales, en número y combinación aún no conocido. En cuanto a la edad de aparición de los síntomas, la forma familiar suele tener presentación presenil, esto es, antes de los 60 ó 65 años y la forma esporádica se suele presentar en etapas seniles, después de los 60 ó 65 años. La forma familiar supone en torno a un 1 - 5% de los casos, según autores, y la forma esporádica el 95 - 99% (Corder y cols. 1993).

Puesto que las formas familiar y monogénica de la EA no se diferencian de forma clara en los síntomas, en la evolución ni en los parámetros clínicos y neuropatológicos estudiados hasta ahora, podemos pensar que deben de existir mecanismos patogénicos comunes. Una de las principales aplicaciones de los estudios sobre la genética molecular de la EA es el conocimiento de estos mecanismos, necesario para un desarrollo racional de estrategias tanto diagnósticas como terapéuticas.

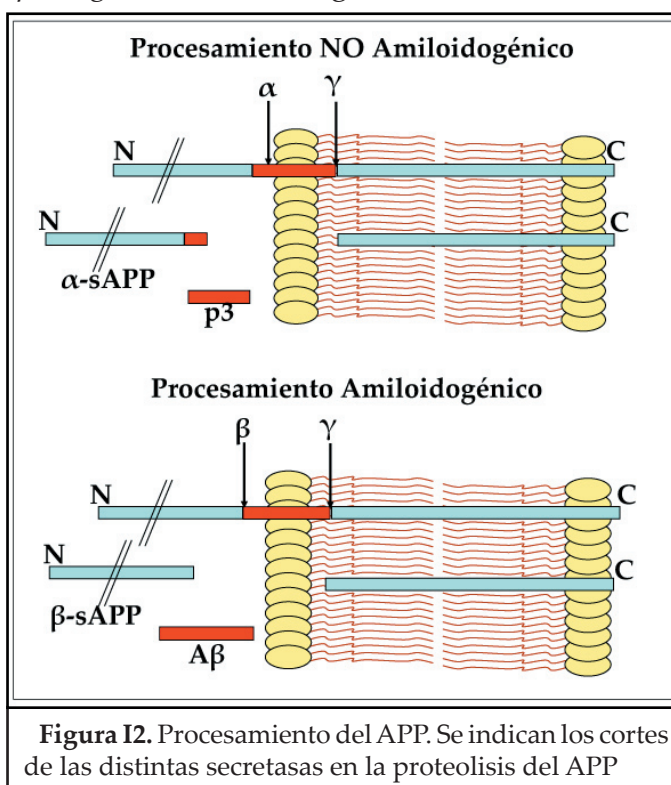
### 2.1.1 Enfermedad de Alzheimer Familiar

Hay 3 *loci* descritos como responsables de la enfermedad: Proteína Precursora del Amiloide (*APP*) (Goate y cols. 1991), Presenilina 1 (*PSEN1*) (Sherrington y cols. 1995) y Presenilina 2 (*PSEN2*) (Levy-Lahad y cols. 1995). Mutaciones en alguno de estos tres genes son responsables de la mayor parte de los casos de EA de aparición temprana y, a pesar de que representan un porcentaje muy pequeño del total de los casos, su descubrimiento es un gran avance para comprender la enfermedad (Hardy 1997; Pericak-Vance y cols. 2000). Podemos encontrar un listado de mutaciones en estos genes en las páginas Web <http://www.molgen.ua.ac.be/> y <http://www.alzforum.org>.

Como ya se ha indicado, el componente mayoritario de las placas neuríticas es un pequeño péptido de 40 - 43 aminoácidos que se denominó péptido A $\beta$ . La secuencia del péptido no mostró homología con proteínas conocidas entonces, pero permitió aislar un gen que codificaba para la proteína que contenía en su secuencia el péptido A $\beta$ ; este gen se ha mapeado en el cromosoma 21 (estas placas también se encuentran en cerebros de pacientes con trisomía del cromosoma 21 o Síndrome de Down, (Teipel y cols. 2006)) y la proteína se denominó "Proteína Precursora del Amiloide" (Glenner y cols. 1984).

El gen *APP* se encuentra en el cromosoma 21, localización 21q21.3. Contiene 18 exones y puede producir hasta 8 isoformas de la proteína por distintos procesamientos de su ARN mensajero, que puede sufrir el *splicing* alternativo de los exones 7, 8 y 15. Las isoformas que se expresan principalmente en las neuronas siempre contienen el exón 15 y son más amiloidogénicas que las isoformas no neuronales. La isoforma más larga tiene 770 aminoácidos, el *splicing* del exón 7 da lugar a una isoforma de 695 aminoácidos que se expresa fundamentalmente en cerebro y el *splicing* del exón 8 da lugar a una isoforma de 751 aminoácidos que, aunque también se puede expresar en el cerebro, es más común en tejidos no neuronales (Rocchi y cols. 2003).

La glicoproteína APP se sintetiza en el Retículo Endoplásmico (RE), de donde viaja a la membrana plasmática vía aparato de Golgi o vesículas secretoras. Ya sea en éstas o en la propia membrana, algunas moléculas sufren un corte proteolítico en el aminoácido 16 del dominio A $\beta$  (que va del aminoácido 597 al 639 de la isoforma de 695), que da lugar a la secreción de un fragmento largo de APP soluble ( $\alpha$ -sAPP) y el péptido p3; en este proceso interviene la  $\alpha$ -secretasa y se conoce como





no amiloidogénico, puesto que evita la formación del péptido A $\beta$ . Sin embargo, el APP de la membrana plasmática puede ser reinternalizado a la célula mediante vesículas recubiertas de clatrina y, a través de la vía endosoma-lisosoma, o bien en el propio retículo, dar lugar al péptido A $\beta$ , mediante la acción conjunta de las  $\beta$  y las  $\gamma$ -secretasas (Rocchi y cols. 2003). La Figura I2 ilustra ambos procesamientos.

Las mutaciones patogénicas del APP están situadas en o alrededor de la secuencia del péptido A $\beta$ , o en los sitios de corte de las secretasas, alterando el procesamiento del APP de tal forma que hay una sobre-producción del péptido A $\beta$  o un desequilibrio entre las formas largas de 42 y 43 aminoácidos (A $\beta$ 42, A $\beta$ 43), más amiloidogénicas y la de 40 aminoácidos (A $\beta$ 40), menos amiloidogénica (Chapman y cols. 2001; Hardy y cols. 2006).

Los genes *PSEN1* y *PSEN2* se encuentran en los cromosomas 14 y 1, localizaciones 14q24.3 y 1q31-q42, respectivamente. Un trabajo anterior al hallazgo de la primera mutación en el gen *APP* ya había señalado el cromosoma 14 como portador de *loci* ligados a la EA familiar (Schellenberg y cols. 1992; St George-Hyslop y cols. 1992). En 1995 se aisló el gen de la Presenilina 1, denominado así por su descubrimiento como causante de EA presenil, y se le identificó como el principal portador de mutaciones responsables de EA monogénica (Sherrington y cols. 1995).

Poco después del hallazgo del gen *PSEN1* se identificó el gen *PSEN2* como portador de mutaciones responsables de algunos casos de EA familiar, y se denominó así por su alto grado de homología con el gen *PSEN1* (Levy-Lahad y cols. 1995); las mutaciones descritas en este gen son mucho menos abundantes que las de *PSEN1*, y la mayor parte de ellas se encuentra en los dominios transmembrana conservados en ambas proteínas. La mayor parte de las mutaciones causantes de EA familiar se encuentran en el gen *PSEN1* y dan lugar a las formas más agresivas de la enfermedad, en cuanto a un inicio muy precoz de los síntomas y un progreso más rápido (Cruts y cols. 1998).

Las proteínas Psen 1 y 2 (*PSEN* gen; Psen, proteína) se localizan mayoritariamente en membranas asociadas al RE y al aparato de Golgi y parece que ambas tienen una organización topográfica semejante, con 8 dominios transmembrana (Mattson y cols. 1998). Hasta hace poco no se conocía su relación con la EA, pero actualmente se sabe que la actividad  $\gamma$ -secretasa es un complejo formado por presenilina, nicastrina (*NCSTN*), alfa-proteína 1 (*APH-1*) y potenciador 2 de Psen1 (*PEN-2*), siendo la presenilina el dominio catalítico del complejo (Dominguez y cols. 2004; Thinakaran y cols. 2004; Gandy 2005).

Las mutaciones asociadas a EA en estos dos genes tienen como consecuencia una pérdida de la función en el complejo  $\gamma$ -secretasa que conduce a un aumento en la relación A $\beta$ 42-43/A $\beta$ 40. (De Strooper 2007; Wolfe 2007)

Por otra parte, se sabe que las Psen son necesarias para la regulación de la diferenciación neuronal, espermátogénesis, oogénesis y miogénesis, posiblemente por su implicación en la vía de señalización de Notch, que para llevar a cabo su función biológica requiere un corte



proteolítico en su extremo C terminal por una actividad de tipo  $\gamma$ -secretasa (Nunan y cols. 2000; Brunkan y cols. 2005).

### 2.1.2. Enfermedad de Alzheimer Esporádica

La mayor parte de los casos de EA son tardíos, con aparición de los síntomas a partir de los 60 ó 65 años, y son esporádicos o presentan una limitada agregación familiar. Si bien las causas de esta forma de EA continúan siendo desconocidas, hay numerosas evidencias de que se trata de una enfermedad multifactorial o compleja en la que influyen al menos un trío de factores interaccionando entre sí: debidos al envejecimiento, ambientales y genéticos. Ninguno de ellos por separado causan la enfermedad, siendo ambos necesarios pero no suficientes para su desarrollo.

#### 2.1.2.1. Factores de riesgo no genéticos

En cuanto a los factores de riesgo ambientales se incluyen la edad avanzada, puesto que el envejecimiento es el principal factor de riesgo para la EA (Amaducci y cols. 1994), el sexo femenino (Fischer y cols. 1991), antecedentes de traumatismo craneal severo con pérdida de conocimiento (Graves y cols. 1990) y ciertas infecciones (Itzhaki y cols. 1997). También se han relacionado con la EA un bajo nivel cultural, nutrición deficiente, abuso de alcohol y exposición a toxinas (Stern y cols. 1994).

El traumatismo craneal es un desencadenante agudo de la cascada de señalización adrenérgica por activación de la Adenilato Ciclasa, lo que resulta en un aumento en los niveles de AMP cíclico (cAMP) (McCudden y cols. 2005). Recientemente, nuestro grupo ha publicado la evidencia de que hay polimorfismos en genes implicados en señalización adrenérgica que están relacionados con la EA esporádica, de manera que el riesgo se correlacionaba con la capacidad de respuesta de las células a la estimulación adrenérgica, sugiriendo que esta vía de señalización podría estar implicada en la patogénesis de la EA esporádica (Bullido y cols. 2004).

Respecto a la posible implicación de agentes infecciosos en la etiología de distintas enfermedades de la edad adulta, entre las que se incluye la EA esporádica, es cada vez más evidente. De hecho, se sabe que ciertos agentes están implicados en algunos tipos de cáncer: más del 95% de los cánceres de cérvix están asociados con la infección por el virus humano del papiloma (Leggatt y cols. 2007); también se ha asociado a los citomegalovirus y a *Chlamydia pneumoniae* con aterosclerosis (Mahmoudi y cols. 2007). Actualmente se considera la posibilidad de que haya una contribución infecciosa también para el desarrollo de la demencia (Dobson y cols. 2003; Itzhaki y cols. 2004c).

Se ha estudiado y descartado la contribución a la EA de distintos agentes infecciosos,

como Adenovirus, Citomegalovirus, Influenza A, Influenza B, virus del sarampión, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis* o *Coxiella burnettii* (Renvoize y cols. 1987); en cuanto a espiroquetas del género *Borrelia*, se ha visto que se induce la deposición de A $\beta$  tras la infección de estos microorganismos (Miklossy y cols. 2006) y hay quien sugiere que es la infección crónica por estos microorganismos la que produce la formación de los ovillos neurofibrilares y que la transmisión nervio-nervio de la infección podría explicar la evolución de la EA (MacDonald 2007).

En cuanto a bacterias del género *Chlamydia*, si bien *C. trachomatis* ha sido descartada si se pueden encontrar datos que asocian a *C. pneumoniae* con EA esporádica, encontrándose *postmortem* presencia del microorganismo en cerebros de enfermos de EA y no en cerebros de individuos sanos (Balin y cols. 1998; Stratton y cols. 2003).

En cuanto a posibles virus que podrían estar relacionados con la EA, en 1982 se sugirió al HSV-1 debido a que en la encefalitis por HSV-1 las regiones del cerebro que antes se afectan, y de forma más severa, son las mismas que en EA muestran los cambios patológicos más tempranos y más severos (Itzhaki 2004a); además, es el virus más prevalente que se encuentra en cerebros humanos adultos de forma latente: se encuentra anticuerpos frente a HSV-1 en el 22% de los individuos de 6 meses a 1 año de edad y en el 60% de los individuos de 21 a 30 años, llegando a un máximo de 89% en individuos de 70 años (Isacsohn y cols. 2002).

Los estudios epidemiológicos más relevantes de la asociación del HSV-1 con la EA han sido realizados por el grupo de la Dra. Ruth Itzhaki, que ha observado que el ser portador del alelo 4 de la apolipoproteína E (ApoE  $\epsilon$ 4) junto con la presencia de genoma de HSV-1 en el cerebro confiere un aumento en el riesgo para padecer EA (Itzhaki y cols. 1997). Por otro lado, nuestro grupo ha observado que la isoforma 4 de ApoE (ApoE4) es más eficiente que la isoforma 3 (ApoE3) para transportar el virus al cerebro en su ruta hematógica (Burgos y cols. 2003; Ramírez Moreno 2006), y que la llegada al cerebro también es dependiente de los niveles de ApoE (Burgos y cols. 2002).

También se ha investigado la posible implicación de distintos agentes infecciosos “no convencionales”, como los priones, pero si bien todos ellos han sido descartados como relacionados con la etiología de la EA, las hipótesis planteadas sobre estos han sugerido la posibilidad de que hay factores genéticos de susceptibilidad que predisponen a infecciones que podrían estar implicados con la patología de la enfermedad (Balin y cols. 2001).

### 2.1.2.2. Factores de riesgo genéticos

La evidencia de que hay factores genéticos implicados en la EA esporádica, o “no genética”, deriva de la observación de que el riesgo de padecerla es mayor en individuos con antecedentes familiares de demencia. Así, estos factores actuarían en distintas combinaciones

para determinar el riesgo genético de la enfermedad en cada individuo.

El principal gen de susceptibilidad conocido para la EA, y que se repite de manera constante prácticamente en todas las poblaciones estudiadas es el de la Apolipoproteína E (*APOE*, gen; ApoE, proteína) (Bertram y cols. 2005). En 1993, como resultado de una búsqueda en familias para las que se había visto ligamiento de EA de edad tardía de aparición de los síntomas con el cromosoma 19 (Pericak-Vance y cols. 1991), se identificó al gen *APOE* (localización 19q13.2) como responsable de este ligamiento (Corder y cols. 1993).

El ApoE presenta tres isoformas comunes, ApoE2, ApoE3 y ApoE4 (alelos  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$ , respectivamente) distribuidas de forma que la isoforma 3 es la mayoritaria y la 2 y la 4 se consideran variantes (Saunders 2001). Se ha encontrado una fuerte asociación del alelo  $\epsilon 4$  de este gen con la enfermedad, si bien desde su descubrimiento se ha hecho evidente que la presencia de ApoE4 no es ni necesaria ni suficiente para el desarrollo de la enfermedad. Se comprobó que este alelo estaba asociado con riesgo en individuos portadores que no tenían antecedentes familiares de demencia, y que se asociaba a casos tanto precoces como tardíos, disminuyendo la edad de aparición de los síntomas de forma dependiente de la dosis alélica de ApoE4 (Corder y cols. 1993). En torno a la edad de 85 años, los individuos homocigotos para el alelo *APOE* $\epsilon 4$  tienen una probabilidad de entre 50 y 90% de desarrollar la EA y los portadores en heterocigosis un 45%, frente al 20% que tiene la población general (Grossman y cols. 2006).

Además del alelo  $\epsilon 4$ , nuestro grupo ha descrito distintos polimorfismos de riesgo para la enfermedad a lo largo de la región promotora de este gen, proporcionando las primeras indicaciones de que cambios en los niveles de expresión de determinados genes también pueden influir en los mecanismos patogénicos de la enfermedad (Bullido y cols. 1998; Artiga y cols. 1998a; Artiga y cols. 1998b).

En cuanto a la función que ApoE desempeña en el cerebro, los astrocitos y la microglía son sus principales productores, participando de una forma muy activa en el mecanismo de regeneración neuronal: estas células liberan ApoE al medio para poder captar los lípidos y el colesterol de las membranas neuronales dañadas, por ejemplo, por trauma, para su regeneración (Poirier 1994). En cualquier caso, el mecanismo por el que ApoE está implicado en la EA no está claro, encontrándose diversas revisiones sobre sus posibles funciones, aunque aún no está claramente determinado cuál o cuáles de ellas son relevantes para el desarrollo de la enfermedad (Mahley y cols. 1996; Saunders 2000). Independientemente del mecanismo, todos los indicios apuntan a que ApoE no es causante de EA, sino que su principal acción sería modificar el curso de la misma, dependiendo de la forma alélica y de la dosis (Meyer y cols. 1998).

Respecto a otros factores genéticos de riesgo, se han desarrollado numerosos estudios de asociación (caso - control) de polimorfismos en genes candidatos a estar relacionados con la patogénesis de la EA, basándose la mayor parte de ellos en diversas hipótesis

patogénicas. Así, se han analizado genes de otras proteasas que podrían participar en la hidrólisis de APP, genes relacionados con inflamación, apoptosis, neurotransmisores, etc. Se puede encontrar un listado de estos genes candidatos clasificados según su función en la página Web <http://www.alzgene.org> (Bertram y cols. 2007). Hasta la fecha se han asociado con la EA polimorfismos en decenas de genes, aunque ninguno de ellos se ha confirmado universalmente.

Para entender la etiopatogénesis de la EA esporádica es necesario conocer el número e identidad de los genes asociados con la enfermedad, su contribución individual y las interacciones entre ellos y con factores ambientales, y es necesario entender la etiopatogénesis para el desarrollo de métodos diagnósticos y terapéuticos.

A día de hoy, entre los numerosos factores genéticos de riesgo descritos, en algunos casos se pueden observar datos contradictorios en las distintas poblaciones de estudio, posiblemente debido a la interacción de estos factores genéticos con los factores ambientales que pueden variar en los distintos grupos poblacionales estudiados.

## **2.2. Mecanismos patogénicos de la Enfermedad de Alzheimer**

Previamente a la realización de esta tesis doctoral, entre los modelos celulares de neurodegeneración puestos a punto por nuestro laboratorio se incluía un modelo de neurodegeneración por convergencia de estrés oxidativo (EO) y estrés de Retículo Endoplásmico (ERE) en el que se obtenía una Respuesta Integrada a Estrés (RIE) y que concluía en que esta situación de convergencia de estreses podría llevar a las neuronas a una mayor vulnerabilidad al estrés y a la apoptosis, y que este modelo permitiría el estudio de los mecanismos moleculares asociados a la neurodegeneración (Vicente Cenzano 2007).

### 2.2.1. Estrés Oxidativo

El oxígeno ( $O_2$ ) es necesario para la vida, y debido a su presencia en los tejidos y al metabolismo normal de la mitocondria se van produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS) en el organismo, que se ve así sometido a un estrés oxidativo (Andersen 2004; Harman 2006). Desde un punto de vista teórico, el cerebro es un órgano especialmente vulnerable a los efectos de las ROS por distintas razones: contiene una concentración elevada de ácidos grasos poliinsaturados, que son muy susceptibles para su peroxidación; utiliza, en comparación con otros tejidos, una gran cantidad de oxígeno para producir energía y en comparación con otros órganos, es un órgano deficiente en sistemas antioxidantes, que además disminuyen con la edad (Mariani y cols. 2005; Zhu y cols. 2007).

Se sabe que durante el envejecimiento normal el cerebro sufre alteraciones morfológicas y funcionales que afectan a los árboles dendríticos, sinapsis, neurotransmisión, circulación y

metabolismo, y estos cambios se ven reflejados en los sistemas motor y sensorial, en el sueño, memoria y aprendizaje. Entre los cambios neuronales producidos por la edad se incluyen la disminución de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  y de la sensibilidad de los sistemas, dopaminérgico, colinérgico, opiáceo y de catecolaminas. Cada vez más, parece que en estas alteraciones tiene que ver una mayor susceptibilidad a los efectos a largo plazo de EO, disfunción mitocondrial (que aumenta con la edad) y daño por inflamación (Mariani y cols. 2005).

Entre las evidencias que relacionan el estrés oxidativo y la EA está el hecho de que el estrés oxidativo puede activar la señalización que altera el procesamiento normal del APP y/o de Tau: se aumenta la expresión de  $\beta$ -secretasas vía JNK y p38 MAPK y se aumenta la hiperfosforilación de Tau por activación de la Glucógeno Sintasa Kinasa 3 (GSK3). También es relevante la inactivación de moléculas críticas por el entorno oxidativo, por ejemplo, se sabe que la prolyl-isomerasa PIN1 es especialmente vulnerable a daño oxidativo, y que cataliza cambios conformacionales que afectan al procesamiento de Tau y de APP (Lin y cols. 2006).

De esta manera, en el modelo de EO de nuestro laboratorio se simularía el envejecimiento normal del organismo. Además, cada vez hay más evidencias de que los primeros cambios neuronales y patológicos característicos de la EA incluyen marcadores de daño oxidativo, indicando que el EO es uno de los factores tempranos que contribuyen al inicio de la enfermedad. De hecho, se ha podido observar que el tratamiento clínico del estrés oxidativo parece que reduce la incidencia y/o la severidad de la enfermedad (Zhu y cols. 2004).

### 2.2.2. Estrés de Retículo Endoplásmico

En distintas enfermedades neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson (EP), Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) o Huntington, se ha observado neuronas con características apoptóticas. La muerte por apoptosis ocurre de manera controlada por la transcripción de ciertos genes, de forma que se ha implicado moléculas relacionadas con la apoptosis en el entorno de la mitocondria y el núcleo. Sin embargo, hay estudios que indican que la muerte neuronal observada en pacientes de EA, EP o isquemia cerebral tiene su origen en el RE, de hecho, se ha observado que la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  está alterada en células expuestas al péptido  $\text{A}\beta$  o en células que sobreexpresan Psen1 mutantes asociadas a la EA, observándose una liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  a una concentración citoplasmática tóxica para la célula (Katayama y cols. 2004; Paschen y cols. 2005).

En una definición muy amplia, estrés es la respuesta de un sistema a alteraciones respecto a un “estado normal”, y para aplicar este término a un orgánulo (por ejemplo, el retículo endoplásmico), habría que redirigir la pregunta hacia cuáles son las funciones fisiológicas del RE y cómo se ven alteradas. Habría que entender cómo se detectan esas alteraciones y qué señales se dan para tratar de restaurar el denominado “estado normal” (Schroder y cols. 2005).



En células eucariotas, el RE, además de ser el lugar de almacenamiento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, es el primer compartimento de la vía secretora. Es responsable de la síntesis, modificación post-traducciona y distribución de las proteínas a sus diferentes destinos. La alta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  que hay en el lumen del RE respecto a la concentración en el citoplasma celular es importante tanto para señalización celular como para el correcto procesamiento de las proteínas de nueva síntesis (Paschen y cols. 2005). El RE ejerce el control de calidad sobre las proteínas, asegurando un procesamiento correcto del producto final que es crucial para el funcionamiento normal de la célula (Lindholm y cols. 2006). Sólo las proteínas que por las modificaciones post-traduccionales se pliegan correctamente pasan al aparato de Golgi, mientras que aquéllas que no han terminado su plegamiento o están plegadas incorrectamente quedan retenidas en el RE para terminar el proceso o se señalizan para su degradación. Además de esta función de plegamiento de proteínas, el RE es el lugar de síntesis de esteroides y lípidos. Cualquier alteración en alguno de estos procesos es causa de ERE (Schroder y cols. 2005).

Distintas situaciones fisiológicas o patológicas que afecten al plegamiento proteico y/o a la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , como privación de glucosa, infecciones virales o la expresión de proteínas mutantes incapaces de plegarse correctamente, pueden ser causa de ERE por acumulación de proteínas mal plegadas, y entonces se produce en las células una respuesta a este estrés, activándose la respuesta a proteínas mal plegadas (*Unfolded Protein Response*, UPR). El plegamiento de proteínas *in vivo* requiere una maquinaria de plegamiento en el RE que se puede sobrecargar, resultando en una acumulación de proteínas mal plegadas y entonces se activa la respuesta UPR para tratar de restablecer el estado normal en el RE.

En estos casos, se puede aumentar la capacidad de plegamiento del RE aumentando la expresión de su maquinaria de plegamiento y de chaperonas como BiP/GRP78 y GRP94 y aumentando el tamaño del RE y, por otro lado, disminuyendo la carga de proteínas mediante un silenciamiento de la traducción y transcripción y eliminando las proteínas mal plegadas y señalizadas como tal. Cuando estos mecanismos no son capaces de remediar la situación de estrés, el RE inicia una señal de alarma al sistema inmune vía NF- $\kappa$ B, y un ERE excesivo y/o prolongado conduce al “suicidio celular”, normalmente por un proceso apoptótico, como último recurso de los organismos multicelulares para librarse de esas células “no sanas”. Este proceso apoptótico se activa vía Chop, vía JNK- kinasa y vía caspasa 12. La decisión final entre supervivencia y apoptosis depende del balance entre las señales para ambos procesos (Paschen y cols. 2005; Xu y cols. 2005; Zhao y cols. 2006).

### 2.2.3. Respuesta Integrada a Estrés

Las células eucariotas responden a las proteínas mal plegadas en el RE, privación de aminoácidos o a condiciones oxidantes fosforilando de forma reversible al factor eIF2 $\alpha$ . Esta fosforilación inhibe la síntesis general de proteínas promoviendo la expresión de la

isoforma 4 del factor activador de la transcripción (ATF4), y activando así la expresión de dianas implicadas en UPR, como Chop. Se trata de una Respuesta Integrada a Estrés (RIE) que regula el metabolismo de aminoácidos y la resistencia al estrés oxidativo; además de adaptar a las células a ERE (Harding y cols. 2003; Bi y cols. 2005). De esta manera, ante situaciones de estrés prolongado, la célula puede derivar hacia procesos apoptóticos y/o autofágicos.

Hay 4 kinasas que pueden fosforilar al complejo eIF2 $\alpha$  y se activan por distintos estímulos. *EIF2AK1* o HRI, que se activa por déficit de grupos hemo en la síntesis de hemoglobina; *EIF2AK2* o PKR, que se activa por la presencia de RNA de doble hebra (normalmente, ante infecciones virales); *EIF2AK3* o PERK, que se activa en respuesta a sobrecarga del RE (ante situaciones de ERE) y *EIF2AK4* o GCN2, que regula el metabolismo general del nitrógeno, y se activa ante ARN transferentes no cargados (Boyce y cols. 2005). La Figura I3 ilustra la señalización génica en la RIE.

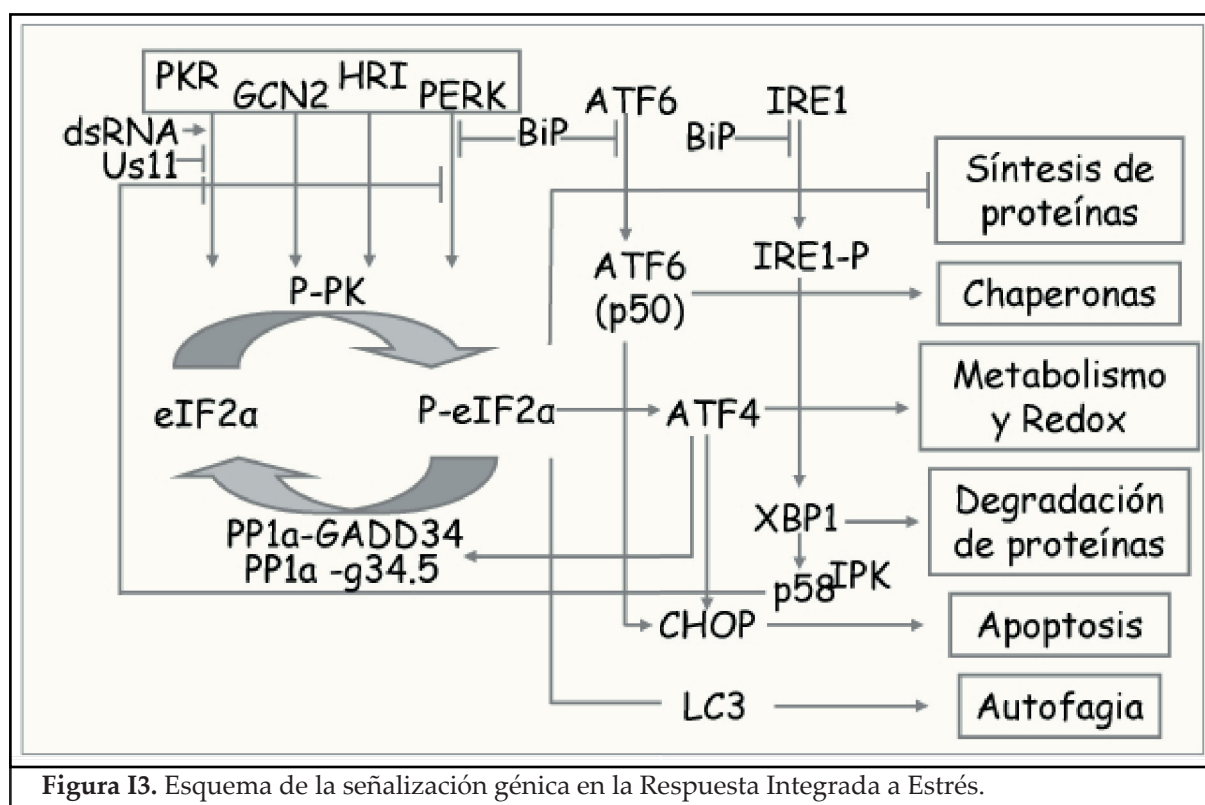


Figura I3. Esquema de la señalización génica en la Respuesta Integrada a Estrés.

### 2.3. Análisis de Asociación

En las enfermedades complejas, como la EA, parecen estar implicados múltiples genes, participando cada uno de ellos con un efecto pequeño, de tal modo que para estas enfermedades los modos de herencia son más complejos que las leyes mendelianas. Los estudios de asociación genética, que comparan frecuencias alélicas entre individuos casos e individuos controles no relacionados familiarmente, son muy potentes para detectar factores genéticos de riesgo en estas enfermedades (Brookes 2001; Bertram y cols. 2004).

Las funciones celulares se llevan a cabo por conjuntos de moléculas que interaccionan entre sí, pudiendo considerarse cada uno de estos conjuntos como un módulo funcional. La mayor parte de las propiedades funcionales de un módulo son colectivas, resultantes de las propiedades de cada uno de sus componentes y de las interacciones entre ellos. Por tanto, en patología molecular, y más en el caso de las enfermedades complejas, no se debe estudiar sólo la relación de un gen con la enfermedad, sino la relación con ella de distintos módulos funcionales.

Aunque la utilidad clínica de los estudios genéticos en las enfermedades complejas requiere todavía una fuerte inversión en conocimiento, los análisis de asociación, particularmente agrupando los genes en módulos funcionales candidatos, son una herramienta poderosa para estudiar la implicación de funciones celulares concretas en la patogénesis de este tipo de enfermedades (Risch 2000).

En la EA, un ejemplo de módulo funcional podría ser el aclaramiento del A $\beta$ : parece que en este proceso intervienen ApoE,  $\alpha$ 2-macroglobulina (A2M) y el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1) (Tanzi y cols. 2001). Si este módulo funcional es relevante en la etiopatogenia de la EA, se podrán detectar interacciones genéticas entre ellos; es decir, analizando el riesgo asociado a polimorfismos en estos tres genes podremos observar que el efecto de cada uno sobre el riesgo depende de la forma alélica del resto.

El objetivo final de los estudios de genética es averiguar cuántos son los factores genéticos y sus combinaciones en estas formas de enfermedad. Se prevé que esto permitirá la elaboración de unos “perfiles de riesgo” que podrían emplearse para predecir de una forma fiable la probabilidad de que un individuo pueda o no padecer la enfermedad y/o responder o no a un tratamiento.

Los estudios genéticos aún no son aplicables a la clínica en la forma esporádica de la EA, como para otras enfermedades complejas; sin embargo, no hay duda sobre su papel fundamental para la investigación básica y para el desarrollo de estrategias terapéuticas por la industria farmacéutica. De hecho, en enfermos de cáncer es posible observar distintas respuestas a fármacos entre los pacientes, que podrían ser debidas a variantes genéticas que puedan afectar a las enzimas que los metabolizan, los transportan o que son dianas de los mismos (Abraham y cols. 2006; Blackhall y cols. 2006).

### 2.3.1. Genes de susceptibilidad

Como ya hemos indicado anteriormente, hay numerosos *loci* ya relacionados con la EA (Bertram y cols. 2007), de forma que es necesario plantearse estrategias de selección de nuevos genes candidatos. Así, los análisis de asociación pueden ser sistemáticos (no sujetos a hipótesis previas) o de genes y polimorfismos candidatos, apoyados ya sea en datos bibliográficos o en datos de la propia línea de trabajo del laboratorio.



De esta manera, para seleccionar los genes candidatos de susceptibilidad para una enfermedad compleja hay distintas aproximaciones, como ilustran los ejemplos de genes que hemos seleccionado para el trabajo de esta Tesis Doctoral.

- Genes relacionados con la infección por *Herpes Simplex Virus* tipo I (HSV-1), puesto que la participación de este virus en la patogénesis de la EA cuenta con un número creciente de evidencias experimentales:

- *EIF2AK2* (Kinasa 2 del Factor 2 $\alpha$  de Inicio de la Traducción, OMIM \*176871), también conocido como *PKR* o *PRKR* (Proteína Kinasa Activada por ARN de doble hebra), es una de las quinasas que tras su activación por infecciones virales aboca a las células a apoptosis por mecanismos que incluyen activación de caspasas, cese de la traducción de proteínas y activación de vías de respuesta a estrés (Peel 2004), ver la Figura I3. Además de su implicación en apoptosis, se ha observado que en cerebros de pacientes de EA, los niveles de PKR fosforilado (la forma activa) eran significativamente mayores que en cerebros de individuos sanos (Onuki y cols. 2004).

- *PVRL2* (Receptor Similar al de Poliovirus 2, OMIM \*600798). Se sabe que este gen codifica para un mediador de la entrada de ciertos herpesvirus y, en el caso de la esclerosis múltiple, se ha visto que alguno de sus polimorfismos genéticos podrían influir en la severidad de la enfermedad, posiblemente debido a que factores virales estén relacionados con el curso de la misma (Schmidt y cols. 2006). Algo similar podría ocurrir con la EA.

- *TAP2*, que codifica para el Transportador Asociado al Procesamiento de Antígenos 2 (OMIM \*170261), que es el principal mecanismo que el HSV-1 emplea para evadir el sistema inmune (Bauer y cols. 2002).

- Genes obtenidos mediante datos experimentales. En nuestro laboratorio se han puesto a punto distintos modelos celulares que pretenden simular situaciones posiblemente relacionadas con el inicio de la EA. Estos modelos son células sometidas a EO, ERE, estrés adrenérgico, que sobreexpresan APP, o combinaciones de estas situaciones. De cada uno de estos modelos se ha realizado un *microarray* de expresión génica para estudiar los genes que modifican sus niveles de expresión. Así, estos genes serían genes de respuesta al estímulo en estudio y posibles genes candidatos de susceptibilidad para la enfermedad. Puesto que son genes de respuesta a estímulos, es interesante estudiar polimorfismos en sus regiones reguladoras, ya que estos pueden modificar la capacidad de respuesta de las células. De los distintos *microarrays* realizados anteriormente en nuestro laboratorio, obtuvimos los siguientes genes candidatos:

- Modelo celular de EO. Entre los 10 genes que más se sobreexpresan en este modelo se encuentran *PLA2G3* (Fosfolipasa A<sub>2</sub> del Grupo 3) y *HMGCR* (Vicente Cenzano 2007).

- Modelo celular de ERE. Se vio sobreexpresión en los genes *DDIT3* (Tránsito 3 Inducible por Daño en el ADN, que codifica para la proteína Chop), *DNAJB9* (Homólogo a DnaJ (*HSP40*), subfamilia B, miembro 9), *EIF2AK3* (Kinasa 3 del factor 2 $\alpha$  de inicio de la traducción, o Perk, Proteín kinasa de retículo endoplásmico), *HSPA5* (Proteína 5 de Choque Térmico de 70 KDa o Grp78, Proteína regulada por Glucosa de 78KDa), *HYOU1* (Proteína 1 Sobre-regulada por Hipoxia, también denominado *ORP150*, -Proteína Reguladora de Oxígeno de 150 KDa-, de la familia de las chaperonas *Heat Shock Protein 70*, HSP70) (Vicente Cenzano 2007).
- Modelo celular de Respuesta Integrada a Estrés (RIE). En los genes para los que se observaba sobreexpresión en el modelo de ERE (*DDIT3*, *DNAJB9*, *EIF2AK3*, *HSPA5* y *HYOU1*), el efecto era aún mayor en el modelo de RIE, especialmente en el gen *DDIT3*. Además, se vio sobreexpresión específica de este modelo en los genes *MAP1LC3B* (Cadena ligera 3 $\beta$  de la proteína 1 Asociada a Microtúbulos) y *PPP1CA* (Isoforma  $\alpha$  de la Subunidad Catalítica de la Proteín-Fosfatasa 1) (Vicente Cenzano 2007).
- Modelo celular de estrés adrenérgico. Se vio sobreexpresión en los genes *ARID4A* (Dominio 4A Interactivo Rico en AT o RBP1, Proteína 1 de Unión a la Proteína de Retinoblastoma), *CAPN9* (Calpaína 9) e *IFT74* (Homólogo del Transportador Intraflagelar 74, o *CCDC2*, Continente del Dominio Súper-Enrollado 2); como gen representativo de genes reprimidos se estudió *TMC5* (Proteína 5 Transmembrana Tipo Canal); por otro lado, *DSC1* (Desmocolina 1) fue estudiado porque se sobreexpresaba tanto con activación adrenérgica con isoproterenol como con estimulación de la Adenilato Ciclasa con forskolina (Ramos Martín 2004), y que posteriormente hemos comprobado que también se sobreexpresa en el modelo de ERE.
- Modelo celular de sobreexpresión de APP. Puesto que está descrito que, en el cerebro, el péptido A $\beta$  es producido principalmente por neuronas (LeBlanc y cols. 1996), que la sobreexpresión de APP conlleva un aumento de la secreción de A $\beta$  (Citron y cols. 1992) y que se observa sobreexpresión de APP en algunas zonas del cerebro de pacientes de EA (Cohen y cols. 1988) se puso a punto en el laboratorio un modelo de células de neuroblastoma humano SK-N-MC que sobreexpresan de forma estable APP (Recuero y cols. 2004). En un *microarray* de expresión se observó sobreexpresión en los genes *GPNUMB* (Glicoproteína (transmembrana) NMB), *COL6A3* (Colágeno del Tipo 6,  $\alpha 3$ ), *CRYAB* (Cristalina  $\alpha B$ ), *ZNF804A* (se trataba de una proteína no identificada, que actualmente se conoce por Proteína Con Dedos de Zinc 804A), *IGFBP7* (Proteína 7 de Unión al Factor de Crecimiento Tipo Insulina) y *GNG12* (Proteína 12 de Unión a Guanina, (proteína G)). Además, nos pareció de interés *MMP2* (Metaloproteína de Matriz 2, que presenta actividad tipo  $\beta$ -secretasa, (LePage y cols. 1995)) (Serrano Carballal 2003).

- Otros genes, obtenidos a partir de datos bibliográficos:

- Causantes de la forma monogénica de la enfermedad: *PSEN1* (OMIM \*104311) es el causante de la mayor parte de los casos de EA Familiar (Cruts y cols. 1998).
- Por su relación con el colesterol, además de *HMGCR*, que codifica para la 3-Hidroxy-3-Metil-Glutaril-CoenzymaA Reductasa (OMIM +142910) y que también aparece en uno de los modelos celulares del laboratorio, se ha visto que el “*ATP-Binding Casette* (Casette de Unión a ATP), subfamilia A” (*ABCA*), que codifica para proteínas implicadas en el transporte de colesterol y fosfolípidos, está relacionada con la EA. En particular, *ABCA2* (OMIM \*600047), se ha identificado como gen de respuesta a colesterol y hay datos que indican que su expresión modula la producción de A $\beta$  (Mace y cols. 2005).
- Genes del metabolismo de la homocisteína (Hcy), que en concentraciones altas es neurotóxica (Obeid y cols. 2006). Además, la Hcy se ha relacionado con la EA, observando mayores niveles de Hcy total en plasma en pacientes de EA que en controles (Clarke y cols. 1998):
  - *MTHFR* (OMIM \*607093) codifica para la proteína Metilen-Tetra-Hidro-Folato Reductasa, que si funciona de un modo incorrecto produce, entre otras cosas, una alteración en los niveles de Hcy en plasma.
  - *MTRR* (OMIM \*602568) codifica para la proteína 5-Metil-Tetra-Hidro-Folato-Homocisteína Metiltransferasa Reductasa, que si funciona de un modo incorrecto también produce, entre otras cosas, una alteración en los niveles de Hcy en plasma.
- Genes de las ADN-Polimerasas. La ADN-Polimerasa Lambda (*POLL*) (OMIM \*606343) es la encargada de reparar daños en el ADN y se expresa en cerebro. Este gen se estudió en colaboración con el Dr. Luis Blanco.
- Los genes *YWHA*, que forman la familia multigénica de las proteínas 14-3-3 o Proteínas de Activación Tirosina 3-monooxigenasa/Triptófano 5- Monooxigenasa, juegan un papel importante en señalización celular, alteraciones transcripcionales frente a cambios ambientales y muerte celular programada. Las isoformas que se expresan en el cerebro son Zeta ( $\zeta$ , *YWHAZ*, OMIM \*601288), Beta ( $\beta$ , *YWHAB*, OMIM \*601289), Gamma ( $\gamma$ , *YWHAG*, OMIM \*605356) y Epsilon ( $\epsilon$ , *YWHAE*, OMIM \*605066). Las isoformas  $\zeta$  y  $\beta$  se unen a la proteína Tau (coimmunoprecipitan en extracto de cerebro),  $\zeta$  causa un aumento en su grado de fosforilación y ambas se encuentran en los ovillos neurofibrilares de cerebros de pacientes de EA (Layfield y cols. 1996; Hashiguchi y cols. 2000); las isoformas  $\gamma$  y  $\epsilon$  están sobreexpresadas en cerebros de pacientes de EA (Fountoulakis y cols. 1999).

Un polimorfismo puede dar resultado positivo en los estudios de asociación por un efecto directo o por estar en desequilibrio de ligamiento con otro polimorfismo cercano, que sea el factor de riesgo real; por ello, la utilidad de los análisis de asociación aumenta cuanto mayor es la densidad del mapa de marcadores con el que podamos trabajar. Debido a esto, los SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*, Polimorfismos de Base Única), estables, muy abundantes y distribuidos de manera uniforme a lo largo de todo el genoma, son los polimorfismos de elección para los estudios de asociación genética en enfermedades complejas o en farmacogenética. Además, la naturaleza de los SNPs (cambios bialélicos de una base por otra) ha permitido desarrollar técnicas automatizadas y de alto rendimiento (*High Throughput*). La capacidad de estas metodologías es enorme, multiplicando por varios órdenes de magnitud la de las más clásicas, basadas en electroforesis en geles (Nowotny y cols. 2001).

Por ello, para estudiar la asociación genética con la EA de los genes a analizar, seleccionamos en cada uno de ellos diferentes SNPs.

### 2.3.2. Estudio funcional de los polimorfismos

Es importante tener en cuenta que para afirmar que un candidato está realmente implicado en la patogénesis de una enfermedad, y saber por qué, es necesario encontrar la conexión funcional entre la variante genética y al menos una función alterada en la enfermedad.

En los modelos celulares de nuestro laboratorio se somete a las células a ERE, a EO y a ambos estreses a la vez (RIE), y se ha observado que la expresión del gen *DDIT3* aumenta en respuesta a ERE y fundamentalmente en respuesta a RIE. Por esto, nos planteamos estudiar SNPs de la región promotora de este gen para analizar si afectan a la capacidad de respuesta celular a dichos estímulos.

#### 2.3.2.1. *DDIT3*

El gen *DDIT3*, (D*N*A-Damage-Inducible Transcript 3), también conocido como *CHOP-10* (CCAAT/ *enhancer binding protein* (C/EBP) Homologous Protein -10), *CHOP*, *CEBPZ* (CEBPζ), *GADD153* (Growth Arrest and DN-Damage inducible gene 153) o *MGC4154* ha sido mapeado en el cromosoma 12, localización q13.1-q13.2. Fue aislado y caracterizado en 1992 por el mismo grupo de investigación que había aislado su homólogo en hámster como un gen de respuesta a daño en el ADN (Luethy y cols. 1990; Park y cols. 1992). La proteína para la que codifica se conoce habitualmente como Chop.

Chop es un factor de transcripción bZip que se activa en respuesta a agentes que alteren de algún modo la maquinaria de plegamiento del RE (Zinszner y cols. 1998). Puede formar

homo o heterodímeros con otros miembros de la familia C/EBP, pero los heterodímeros no se unen a los sitios clásicos de unión C/EBP, de tal forma que, desde el punto de vista de estos sitios diana, Chop es inhibidor de estos factores de transcripción. Sin embargo, los homodímeros de Chop sí son capaces de unirse a otras secuencias específicas diferentes de las clásicas C/EBP. Así, Chop tiene un papel dual inhibiendo la función de C/EBPs y activando otros genes diana diferentes (Wang y cols. 1998; Oyadomari y cols. 2004). Se ha visto que la sobreexpresión de *DDIT3* y la microinyección de la proteína Chop conduce a parada del ciclo celular y/o a apoptosis, mientras que ratones deficientes en este gen muestran apoptosis reducida en respuesta a ERE (Oyadomari y cols. 2004), y deficiencias en su expresión pueden proteger a las células de la apoptosis producida por ERE (Oyadomari y cols. 2002). Así pues, la proteína Chop juega un papel clave en la inducción de la apoptosis celular.

En las enfermedades neurodegenerativas se observa una acumulación de proteínas mal plegadas. En el caso de la EA, se ha observado que mutaciones en el gen *PSEN1* aumentan los niveles de proteína Chop. De hecho, se ha observado que se da una respuesta al estrés exagerada en células con mutaciones en *PSEN1* (Katayama y cols. 2004), si bien este nivel de respuesta tan elevado se debía a una mayor traducción del mensajero Chop, más que a un mayor nivel de transcripción. Se ha sugerido que Chop contribuye a la acción patogénica de *Psen1* sensibilizando a las células para la apoptosis (Milhavet y cols. 2002).



---

## OBJETIVOS

---





### 3. OBJETIVOS

Con el fin de encontrar nuevos factores genéticos de susceptibilidad para la EA y dianas terapéuticas que también puedan ser empleados como posibles marcadores patogénicos de la misma, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Desarrollar estudios de asociación genética con la Enfermedad de Alzheimer de polimorfismos en genes candidatos potencialmente implicados en la patogénesis de la enfermedad:
  - 1a. Genes relacionados con la infección por HSV-1.
  - 1b. Genes obtenidos mediante datos experimentales, procedentes de diferentes modelos celulares.
  - 1c. Otros genes, obtenidos a partir de datos bibliográficos.
2. En su caso, desarrollar estudios para encontrar la vinculación funcional de la variante genética con el fenotipo “Enfermedad de Alzheimer”. En este contexto, nos centraremos en la región promotora del gen *DDIT3*, como gen clave en la inducción celular a apoptosis, con los siguientes objetivos concretos:
  - 2a. Clonaje de la región promotora en vectores que expresen genes reporteros.
  - 2b. Expresión de las diferentes variantes genéticas en células neuronales SK-N-MC mediante transfección transitoria y estable.
  - 2c. Estudio del efecto de las variantes genéticas sobre la actividad transcripcional de la región promotora, en condiciones basales y de estrés.



---

## MATERIALES Y MÉTODOS

---



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Reactivos

Los reactivos empleados en cada ensayo se detallan en los apartados correspondientes. Todos los reactivos son de grado analítico.

### 4.2. Muestras humanas: pacientes y controles

En el laboratorio disponemos de tres muestras caso - control para el análisis de genotipos: una muestra de referencia (España - Centro), en la que se analizan todos los SNPs seleccionados para los estudios de asociación, y dos muestras de réplica (España - Cataluña y Canadá), en las que se analizan aquellos polimorfismos en los que se observan datos interesantes en la muestra de referencia. Todos los individuos dieron su consentimiento para ser incluidos en estudios de genética que habían sido aprobados por los Comités de Ética de las instituciones participantes.

#### 4.2.1. Muestra de España - Centro

Los casos son 248 individuos con una edad de aparición de los síntomas de entre 43 y 109 años ( $71.0 \pm 10.6$  años; media  $\pm$  desviación estándar), siendo un 64% mujeres. Prácticamente la totalidad de los casos presentan la forma esporádica de la enfermedad. Todos los casos proceden de servicios de Neurología o Geriatria del área Central de España (Madrid y Segovia), donde habían sido clínicamente evaluados y diagnosticados como EA probable, de acuerdo a los criterios NINCDS-ADRDA (McKhann y cols. 1984) o mediante DSM-IV ("*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*") (Folstein y cols. 1975).

Los controles son 347 individuos de la misma región de España que los casos y ajustados a ellos por año de nacimiento (edad de examen  $71.1 \pm 14.4$  años) y género (el 60% de ellos son mujeres). No presentaban signos de demencia según un examen Mini-Mental realizado por los mismos servicios de Neurología y/o Geriatria que proporcionaron los casos.

La mayor parte de esta muestra había sido previamente genotipada para *APOE*: isoformas 2, 3 y 4, además de 4 sitios polimórficos en el promotor (-491, -427, -219 y +113, relativos al sitio de iniciación de la transcripción), así como para otros genes también relacionados con la EA (Bullido y cols. 1998; Artiga y cols. 1998a; Bullido y cols. 2000a).

### 4.2.2. Muestra de España - Cataluña

Los casos son 342 individuos con una edad de aparición de los síntomas entre 55 y 95 años ( $74.9 \pm 6.0$  años), siendo un 71% mujeres. Todos los casos proceden de la región de Noreste de España (fueron reclutados en Reus) y presentan la forma esporádica de la enfermedad, habiendo sido diagnosticados como EA probable según los criterios de NINCDS-ADRDA o mediante DSM-IV.

Los controles son 222 individuos de la misma región que los casos y ajustados a los casos por año de nacimiento (edad de examen  $71.3 \pm 8.3$ ) y género (el 53% de ellos son mujeres). No presentaban signos de demencia, según exámenes Mini-Mental, MEC y WAIS-Cubes, realizados por los mismos servicios de Neurología y Geriátrica que proporcionaron los casos.

Toda la muestra había sido previamente genotipada para *APOE*: isoformas 2, 3 y 4, y está descrita en detalle (Rosich-Estrago y cols. 2004).

### 4.2.3. Muestra de Canadá

Los casos son 116 individuos con una edad de aparición de los síntomas de entre 42 y 89 años ( $70.4 \pm 10.5$  años), siendo un 62% mujeres. Todos estos individuos fueron diagnosticados como EA seguro mediante autopsia en el "*London Health Sciences Center, University of Western Ontario*"; los criterios para EA incluyeron el diagnóstico de demencia por un neurólogo y una puntuación NIA/Reagan que mostró que había una alta probabilidad de que la demencia diagnosticada fuese debida a EA.

La muestra control consta de 190 individuos de la misma región que los casos y ajustados a ellos por año de nacimiento (edad de examen  $76.3 \pm 7.7$  años) y género (el 49% de ellos son mujeres). Los criterios para diagnosticar los controles fueron un estado mental normal en un examen clínico previo a la muerte, no necesariamente certificado por un neurólogo, y una puntuación NIA/Reagan que mostraba poca probabilidad de EA (1997; Hyman y cols. 1997).

Toda la muestra había sido previamente genotipada para *APOE*: isoformas 2, 3 y 4.

### 4.3. Búsqueda y estudio de SNPs de interés

En el contexto del Proyecto Genoma Humano se han encontrado más de 2,000.000 de SNPs distribuidos a lo largo de todo el genoma, que se encuentran en distintas bases de datos públicas y/o privadas, si bien actualmente todas las bases de datos están interrelacionadas entre sí. El uso de toda la información presente en estas bases de datos permite determinar qué SNPs son interesantes para los estudios de asociación genética.

Para la selección de los SNPs de interés para los estudios de asociación se ha seguido el siguiente protocolo:

Según la bibliografía y/o los resultados de los distintos modelos celulares puestos a punto por el laboratorio se concretaron los *loci* de interés, y de las bases de datos se obtuvo la lista de SNPs asociados a cada *locus*. Las bases de datos empleadas, por ser las más actualizadas en el momento de estudio, fueron las del *National Center for Biotechnology Information*, (NCBI, dbSNP) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>, versión *Build 126*), y la del *The SNP Consortium*, (TSC) (<http://snp.cshl.org>).

Una vez obtenida la lista de SNPs relacionados con un *locus*, éstos se clasificaron para analizar aquellos que nosotros consideramos más interesantes, esto es, los que en las bases de datos están validados, con una frecuencia del alelo minoritario de al menos el 10% y que potencialmente pudiesen cambiar alguna función: cambios de aminoácido, que se hallen en regiones reguladoras de la expresión del gen, del *splicing* o que pudieran estar relacionados con la estabilidad de ARN mensajero.

Para la “selección funcional”, desde el año 2005 podemos obtener información acerca de las funciones que podrían verse alteradas por los SNPs en los programas informáticos de las páginas Web de SNP3D (<http://www.snps3d.org>), PupaSuite (<http://pupasuite.bioinfo.cipf.es>) o Chip Mapper (<http://bio.chip.org/mapper>). Si observamos que los SNPs de las regiones promotoras podían alterar el sitio de unión de algún factor de transcripción, se buscó la función de estos factores en la página ExPASy (*Expert Protein Analysis System*, <http://www.expasy.org>), un servidor de proteómica de “The Swiss Institute of Bioinformatics” (SIB).

Cuando se encontraron varios SNPs de interés en un mismo gen, se utilizaron métodos para estimar o determinar los haplotipos, que pueden ser mucho más informativos que los sitios polimórficos estudiados individualmente. Una base de datos que incluye haplotipos es la del proyecto de haplotipado del genoma humano, HapMap (<http://www.hapmap.org>), y una buena herramienta disponible desde 2005 para trabajar con ellos es el *software* SNPBrowser™, de Applied Biosystems.

Cuando se observó que los SNPs estudiados en un mismo gen estaban parcial o totalmente ligados, se calculó su “valor *d*”, referente al desequilibrio de ligamiento presente entre estos SNPs. El “valor *d*” entre un SNP A y un SNP B va de -0.25 a 0.25, de manera que el valor máximo se da si las frecuencias de los 4 alelos (A1, A2, B1, B2) son iguales entre sí

y a 0.50 y los alelos A1 y B1 y los A2 y B2 van siempre en el mismo cromosoma y el valor mínimo se da si las frecuencias de los 4 alelos (A1, A2, B1, B2) son iguales entre sí y a 0.50 y los alelos A1 y B2 y los A2 y B1 van siempre en el mismo cromosoma ([http://www.uam.es/personal\\_pdi/ciencias/gpepe/g-poblaciones/clases/Tema\\_06/desequilibrio-de-ligamiento.htm](http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/gpepe/g-poblaciones/clases/Tema_06/desequilibrio-de-ligamiento.htm)).

Así, los SNPs que seleccionamos por considerarlos interesantes se muestran en la Tabla M1. En algunos casos, los SNPs se seleccionaron en colaboración con Raquel Tenorio Vela, de nuestro laboratorio.

TABLA M1

Lista de SNPs analizados

Gen	LocusID	Chr.	dbSNP *	A1	A2	Localización**	Técnica
RELACIONADOS CON LA INFECCIÓN POR HERPES SIMPLEX VIRUS TIPO I							
EIF2AK2	5610	2	rs2254958	T	C	5'UTR -308	TaqMan
			rs4648174	G	A	Intrón 4	TaqMan
			rs3770768	C	T	Intrón 13	TaqMan
PVRL2	5819	19	hCV11711387	T	C	Promotor -7004	TaqMan
			rs3745150	G	C	3' gen +3882	TaqMan
TAP2	6891	6	rs241447	G	A	Ala665Thr	FRET
			rs241448	C	T	Gln687Stop	TaqMan
INDUCIDOS POR ESTRÉS OXIDATIVO							
PLA2G3	50487	22	rs3788428 *	C	T	Promotor -940	TaqMan
			rs9619169 *	C	A	Promotor -749	TaqMan
			rs2232170	C	T	Promotor -529	TaqMan
			rs2074734	C	G	Glu116Gln	FRET
			rs2074735	G	C	Leu157Val	FRET
			rs2072193	G	C	Ser322Arg	TaqMan
			rs740231 *	A	G	3'UTR +558	TaqMan
HMGCR	3156	7	rs3761740	A	C	Promotor, -966	TaqMan
			rs5909	G	A	3'UTR +8	TaqMan
INDUCIDOS POR ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO							
DDIT3	1649	12	rs3847699	C	G	Promotor -1507	TaqMan
DNAJB9	4189	7	rs2227272	T	C	Promotor -783	TaqMan
EIF2AK3	9451	2	rs1805164	G	A	Gln597Gln	TaqMan
			rs1805165	T	G	Val704Ser	TaqMan
HSPA5	3309	9	rs17840761	C	T	Promotor -370	TaqMan
			rs391957 *	A	G	Promotor -415	TaqMan
HYOU1	10525	11	rs13929 *	C	G	3'UTR +550	TaqMan
			rs1003081 *	A	C	3' gen +907	TaqMan
RELACIONADOS CON LA RESPUESTA INTEGRADA A ESTRÉS							
MAP1LC3B	81631	16	rs11117269	T	C	Promotor -740	TaqMan
			rs9903	C	T	3'UTR +405	TaqMan
PPP1CA	5499	11	rs7480390 *	G	C	Promotor -223	TaqMan
INDUCIDOS POR ESTRÉS ADRENÉRGICO							
ARID4A	5926	14	rs1051858	G	A	Ala779Thr	TaqMan



CAPN9	10753	1	rs3895368 *	C	T	Promotor -57	TaqMan
			rs1933631	C	A	Gln322Lys	TaqMan
DSC1	1823	18	rs1789072 *	A	G	Intrón 15	TaqMan
IFT74	80173	9	rs3429 *	T	C	Ile432Thr	TaqMan
TMC5	79838	16	rs2245086	T	C	3'UTR +45	TaqMan

**INDUCIDOS POR SOBREEXPRESIÓN DE APP**

GPNMB	10457	7	rs199348 *	A	C	Intrón 2	TaqMan
			rs858239 *	G	A	Promotor -1	TaqMan
COL6A3	1293	2	rs7599762 *	C	G	Promotor -65	TaqMan
			rs2645779 *	A	G	Intrón 1	TaqMan
			rs7436	A	T	3'UTR +606	TaqMan
CRYAB	1410	11	rs762550	G	A	Promotor -626	TaqMan
			rs4252583 *	T	C	Promotor -348	TaqMan
			rs14133	G	C	Promotor -224	TaqMan
ZNF804A	91752	2	rs10497655	C	T	Promotor -1052	TaqMan
IGFBP7	3490	4	rs4075349	A	G	Promotor -417	TaqMan
			rs3755906 *	T	A	Intrón 2	TaqMan
GNG12	55970	1	rs2295942 *	A	G	Intrón 3	TaqMan
MMP2	4313	16	rs2287073	G	C	Promotor -61	TaqMan
			rs2287074	G	A	Thr460Thr	TaqMan
			rs7201	C	A	3'UTR +261	TaqMan

**CAUSANTES DE LA FORMA MONOGÉNICA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

PSEN1	5663	14	rs3025786	C	T	Intrón 7	FRET - TaqMan
			rs165932 *	T	G	Intrón 8	RFLP - FRET

**RELACIONADOS CON EL METABOLISMO DEL COLESTEROL**

ABCA2	20	9	rs908832 *	C	T	Asp479Asp	TaqMan
-------	----	---	------------	---	---	-----------	--------

**RELACIONADOS CON EL METABOLISMO DE LA HOMOCISTEÍNA**

MTHFR	4525	1	rs1801133	C	T	Val222Ala	FRET
			rs1801131	C	A	Glu429Ala	FRET
MTRR	4552	5	rs1801394	G	A	Ile22Met	TaqMan

**REPARACIÓN DE DAÑOS EN EL ADN**

POLL	27343	10	rs3730477	T	C	Trp438Arg	TaqMan
------	-------	----	-----------	---	---	-----------	--------

**FAMILIA MULTIGÉNICA DE LAS PROTEÍNAS 14-3-3**

YWHAB	7529	20	rs3208334	A	G	3' UTR +93	FRET
-------	------	----	-----------	---	---	------------	------

**Tabla M1.** Lista de SNPs estudiados.

Se agrupan los genes en función de la aproximación de la que surgen como candidatos.

Para cada SNP se muestra el gen en el que se encuentra con su LocusID (del NCBI), cromosoma en el que está (Chr.), código dbSNP, alelos en el contexto génico (A1 y A2), localización en la proteína (SNPs codificantes) o en el gen (SNPs en regiones reguladoras) y la técnica o técnicas empleada(s) para el genotipado.

\* La ficha en el dbSNP Build 126 de los SNPs señalados muestra la secuencia reverso-complementaria respecto al contexto génico.

\*\* La localización génica de los polimorfismos de promotor se refiere siempre al inicio de la transcripción; la de los polimorfismos de las regiones 5' y 3' UTR se refiere, respectivamente al inicio y a la parada de la traducción; de los polimorfismos señalados como 3' gen se refiere al final de la transcripción.

#### 4.4. Análisis de genotipos

Según el año de estudio de cada SNP se empleó una u otra técnica, siendo cada una de más alto rendimiento que la anterior. La Tabla M1 muestra los polimorfismos analizados, su identificación, gen al que pertenecen y localización dentro del gen, además de la técnica que se empleó para cada uno.

##### 4.4.1. Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos de Restricción (R.F.L.P.)

Se trata de una técnica en la que podemos diferenciar polimorfismos mediante el análisis de los fragmentos generados por cortes específicos en el ADN con endonucleasas de restricción. Son enzimas que cortan el ADN en secuencias específicas, dependiendo de la enzima empleada, ya que cada una tiene una diana específica.

El fundamento teórico de esta técnica se basa en que puede ocurrir que un alelo con su secuencia flanqueante forme una diana de restricción y otro no, de tal forma que tras una PCR y posterior digestión enzimática del amplificado podemos diferenciar los alelos en un gel según los tamaños de los fragmentos obtenidos tras la digestión.

Esta técnica fue empleada para completar el análisis del SNP del Intrón 8 de *PSEN1*, [rs165932](#), en los individuos de la muestra de España - Centro con edad de aparición de los síntomas a partir de 60 años, según métodos descritos (Aldudo y cols. 1997).

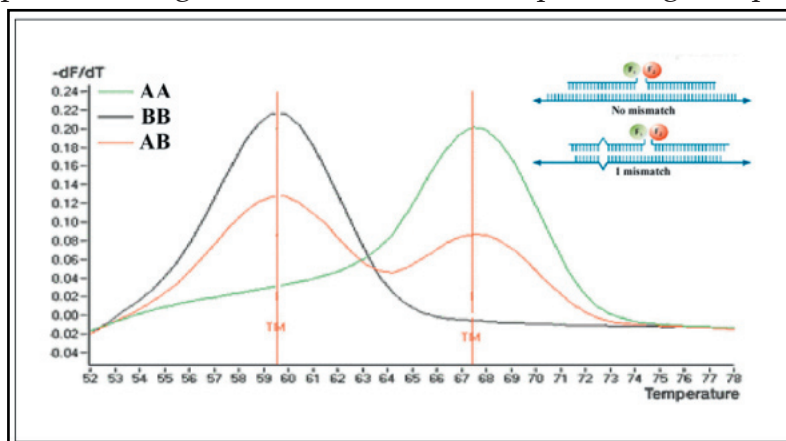
##### 4.4.2. Transferencia de Energía Fluorescente por Resonancia (F.R.E.T.)

El uso de las sondas FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) en un aparato de PCR a tiempo real (*LightCycler*® de Roche) para genotipar es un procedimiento rápido y sencillo, que presenta ventajas considerables sobre métodos más tradicionales como las enzimas de restricción para el análisis de grupos numerosos de individuos, como la genotipación en el mismo proceso de la PCR, sin más manipulaciones o el alto rendimiento (*High Throughput*), entre otras (Wittwer y cols. 1997; Bernard y cols. 2000).

En esta técnica se emplean dos sondas que hibridan en nuestro amplificado de tal modo que una de ellas (*anchor*) hibrida siempre perfectamente con la secuencia de éste y la otra (*sensor*) hibrida perfectamente o con un desapareamiento dependiendo del alelo. La sonda *sensor* lleva incorporada fluoresceína, y la sonda *anchor* un fluoróforo rojo (LC-Red640 o LC-Red705); cada marca está incorporada en un extremo de la sonda, de tal forma que cuando ambas sondas están unidas al ADN las dos marcas fluorescentes quedan adyacentes. Por una emisión de energía de longitud de onda determinada del *LightCycler*®, la fluoresceína se excita y le transfiere la energía al fluoróforo rojo, que emite una fluorescencia roja que el aparato detecta.

El fundamento teórico de la genotipificación con sondas FRET se resume en que

si en un SNP bialélico determinado tenemos los alelos “A” y “B”, tras realizar la PCR seguida de una desnaturalización (*melting*) obtendríamos un gráfico de fluorescencia en función de la temperatura, en la que se distinguen claramente los tres posibles genotipos gracias a la representación de las distintas temperaturas de desnaturalización o *melting* ( $T_m$ ) de cada uno de los alelos. Si hay un desapareamiento respecto a la sonda la disminución de la fluorescencia ocurre de 3 a 5°C por debajo de la  $T_m$  de la sonda, diferencia fácilmente observable para determinar qué genotipo es el analizado (Bernard y cols. 1998). Ver Figura M1.



**Figura M1.** Figura teórica de los tres genotipos observados con la técnica de sondas FRET. En la esquina superior derecha se observa el esquema de la hibridación de las sondas, con desapareamiento o no según el alelo que se encuentre en el SNP.

Esta técnica fue empleada para analizar los siguientes SNPs:

- [rs1801131](#), A1298C en *MTHFR* (Glu429Ala), en toda la muestra de España - Centro. Las condiciones de PCR son  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  3 mM, oligonucleótidos 0.6  $\mu\text{M}$ , sondas 0.1  $\mu\text{M}$ , con el kit de Roche (*Lightcycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes*). El programa de PCR consta de una desnaturalización inicial a 95°C 10 minutos, 50 ciclos de 95°C 15 sg, 57°C 15 sg y 72°C 15 sg, desnaturalización lenta de 50 a 75°C y enfriamiento 40°C 30 sg. Las secuencias de los oligonucleótidos y sondas fueron (de 5' a 3'): Pr-U GCA ATT CCT CTT CCC CTG CC, Pr-L TCC CCA CTT CCA GCA TCA CTC, Sensor (A) CTT CAA AGA CAC TTT CTT CAC TGG TC-Fluoresceína y Anchor LCR640-CTC CTC CCC CCA CAT CTT CAG CAG. El pico con  $T_m$  58°C representa al alelo C y con 65°C al alelo A. El tamaño del amplificado es de 202 pares de bases (pb).
- [rs2074734](#), C346G en *PLA2G3* (Gln116Glu), en toda la muestra de España - Centro. Las condiciones de PCR son  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  2 mM, oligonucleótidos 0.8  $\mu\text{M}$ , sondas 0.1  $\mu\text{M}$ , con el kit de Roche (*Lightcycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes*). El programa de PCR consta de una desnaturalización inicial a 95°C 10 minutos, 50 ciclos de 95°C 15 sg, 57°C 15 sg y 72°C 15 sg, desnaturalización lenta de 40 a 80°C y enfriamiento 40°C 30 sg. Las secuencias de los oligonucleótidos y sondas fueron (de 5' a 3'): Pr-U CGG TGC TCT CTG TGC TCA T, Pr-L ACA CCC CTC ATG GCT CAC, Sensor (C) CAT GCC TCC CAC TGA CTC TGA A-Fluoresceína y Anchor LCR640-AGT GGC CAG TGC TCT CTG CAG CTC. El pico con  $T_m$  54°C representa al alelo C y con 63°C al alelo G. El tamaño del amplificado es de 284 pb.
- [rs2074735](#), C469G *PLA2G3* (Val157Leu), en toda la muestra de España - Centro. El amplificado y las condiciones de PCR son las mismas que para el polimorfismo [rs2074734](#), con las sondas Sensor (C) CAT GCC TGG CAC ACT GTG G-Fluoresceína y

*Anchor* LCRed705-GTG GAG TTG GAG ATT CTG CTG GGA ACT C. El pico con  $T_m$  54°C representa al alelo G y con 64°C al alelo C.

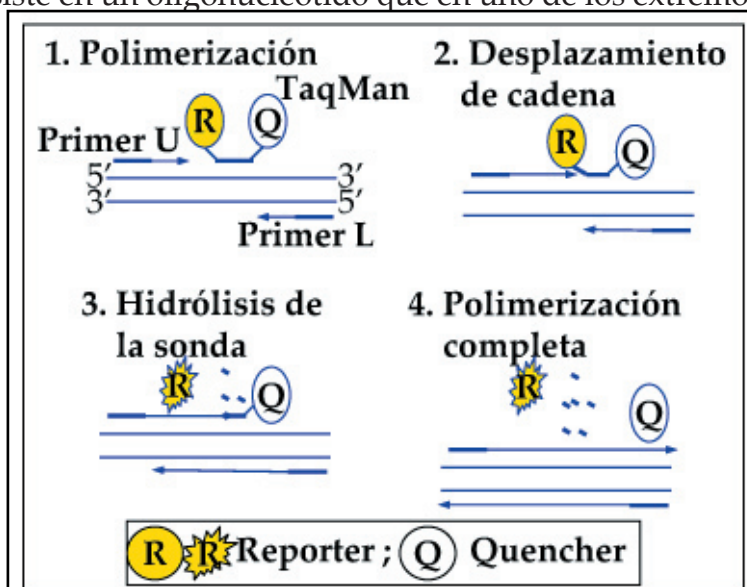
- [rs3025786](#), del Intrón 7 de *PSEN1* en la muestra de España - Centro. Las condiciones de PCR son  $Cl_2Mg$  3 mM, oligonucleótidos 1  $\mu M$ , sondas 0.1  $\mu M$ , con el *kit* de Roche (*Lightcycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes*). El programa de PCR consta de una desnaturalización inicial a 95°C 10 minutos, 50 ciclos de 95°C 20 sg, 50°C 20 sg y 72°C 20 sg, desnaturalización lenta de 50 a 80°C y un enfriamiento a 40°C 30 sg. Las secuencias de los oligonucleótidos y sondas son (de 5' a 3'): Pr-U GTT CAC CTG CCA TTT ATT TCA TA, Pr-L TTC TCT CCT GAG CTG TTT CAA, *Sensor* (C) CAT TTT ATT AGA TGT CTC TTA TGT TTT TC-Fluoresceína y *Anchor* LCRed640-TTT CTA GAT TTA GTG GCT GTT TTG TGT CC. El pico con  $T_m$  53°C representa al alelo C y con 60°C al alelo T. El tamaño del amplificado es de 225 pb.
  
- [rs165932](#), del Intrón 8 de *PSEN1* en los individuos de la muestra de España - Centro de entre 40 y 59 años. Las condiciones de PCR fueron  $Cl_2Mg$  2.5 mM, oligonucleótidos 0.4  $\mu M$ , sondas 0.2  $\mu M$ , con el *kit* de Roche (*Lightcycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes*). El programa de PCR consta de una desnaturalización inicial a 95°C 10 minutos, 50 ciclos de 95°C 20 sg, 50°C 20 sg y 72°C 20 sg, desnaturalización lenta de 40 a 75°C y enfriamiento a 40°C 30 sg. Las secuencias de los oligonucleótidos y sondas fueron (de 5' a 3'): Pr-U GTT CAC CTG CCA TTT ATT TCA TA, Pr-L ACA AGT ACC ATG AAA ATG ACC AT, *Sensor* (G) CAA TAA GTA TTT GAG AAG GAT ATT G-Fluoresceína y *Anchor* LCRed640-TTA GTA ATC AGT GTA GAA TTT ATC GGA AC. El pico con  $T_m$  48°C representa al alelo T (Alelo 1) y con 52°C al G (Alelo 2). El tamaño del amplificado es de 348 pb.
  
- [rs241447](#), G1993A de *TAP2* (Ala665Thr) en todos los individuos de la muestra de Canadá. Las condiciones de PCR son  $Cl_2Mg$  2,5 mM, oligonucleótidos 0.8  $\mu M$ , sondas 0.1  $\mu M$ , con el *kit* de Roche (*Lightcycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes*). El programa de PCR consta de una desnaturalización inicial a 95°C 10 minutos, 50 ciclos de 95°C 20 sg, 56°C 20 sg y 72°C 15 sg, desnaturalización lenta de 40 a 80°C y enfriamiento 4°C 30 sg. Las secuencias de los oligonucleótidos y sondas fueron (de 5' a 3'): Pr-U TTC CTG TCT TTC TGA GGC ACT, Pr-L TCC TGG AGC ACC AGG ATC T, *Sensor* (G) CGC GCT GAA CTG CCT GCA-Fluoresceína y *Anchor* LCRed640-CCT GTG AGC AAT CAC CAG CAC TGT GC. El pico con  $T_m$  58°C representa al alelo A y con 65°C al alelo G. El tamaño del amplificado es de 135 pb. Por la optimización del protocolo de Roche con este SNP para el empleo de las sondas FRET para genotipado obtuvimos el "Premio Roche Applied Science en Aplicaciones del Sistema *LightCycler*®" en 2003. (Martínez-García y cols. 2004) (Anexo II-B).
  
- [rs3208334](#), en la región 3' UTR de *YWHAB* en la muestra de España - Centro. Las condiciones de PCR son  $Cl_2Mg$  2m M, oligonucleótidos 0.4  $\mu M$ , sondas 0.1  $\mu M$ , con el *kit* de Roche (*Lightcycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes*). El programa de

PCR consta de una desnaturalización inicial a 95°C 10 minutos, 50 ciclos de 95°C 15 sg, 52°C 15 sg y 72°C 15 sg, desnaturalización lenta de 35 a 75°C y enfriamiento 40°C sg. Las secuencias de los oligonucleótidos y sondas fueron (de 5' a 3'): Pr-U GCT TTG ATT ATA CTT CCT TTC TCT TGC, Pr-L GCT GTT TAT CCC ATG AAC CAT, *Sensor* (G) LCR640-TAC GAT TCT CTT TTC TTT TTT TTT y *Anchor* Fluoresceína-AGG CTG TGA AAA ATC GAA AGT CGA. El pico con  $T_m$  40°C representa al alelo A y con 47°C al alelo G. El tamaño del amplificado es de 245 pb.

#### 4.4.3. Sondas de Hidrólisis (TaqMan®)

Esta técnica de genotipado está optimizada para otro aparato de PCR a tiempo real, el *AbiPrism® 7900HT Sequence Detection System*, de Applied Biosystems. También incluye una sonda en la reacción de amplificación, por lo que la reacción de amplificación y genotipado se lleva a cabo en un único paso. Esta sonda hibrida con el amplificado en el paso de anillamiento y elongación y cuando la Taq polimerasa llega a ella la corta con su actividad 5'exonucleasa (éste es el motivo de que el anillamiento y la elongación se lleven a cabo en un paso, a la misma temperatura, 60°C, para que la enzima presente esta actividad). El corte de la sonda solamente se produce si la sonda está perfectamente hibridada al molde, sin embargo, si hay algún desapareamiento, la sonda se despegará íntegra del molde por desplazamiento de la nueva cadena en elongación.

Empleando una sonda fluorogénica podemos analizar las muestras sin procesamientos posteriores a la PCR. Esta sonda consiste en un oligonucleótido que en uno de los extremos lleva un marcador fluorescente (*reporter*) y en el otro extremo un silenciador de la señal fluorescente (*quencher*). En la sonda íntegra, la proximidad del *quencher* reduce la señal fluorescente y cuando se produce el corte de la sonda la señal fluorescente se libera, provocando un aumento en la intensidad de la fluorescencia. De esta forma, un aumento de la señal fluorescente indica que la diana específica de la sonda se ha amplificado (Livak 1999). La Figura M2 ilustra cómo funcionan estas sondas.



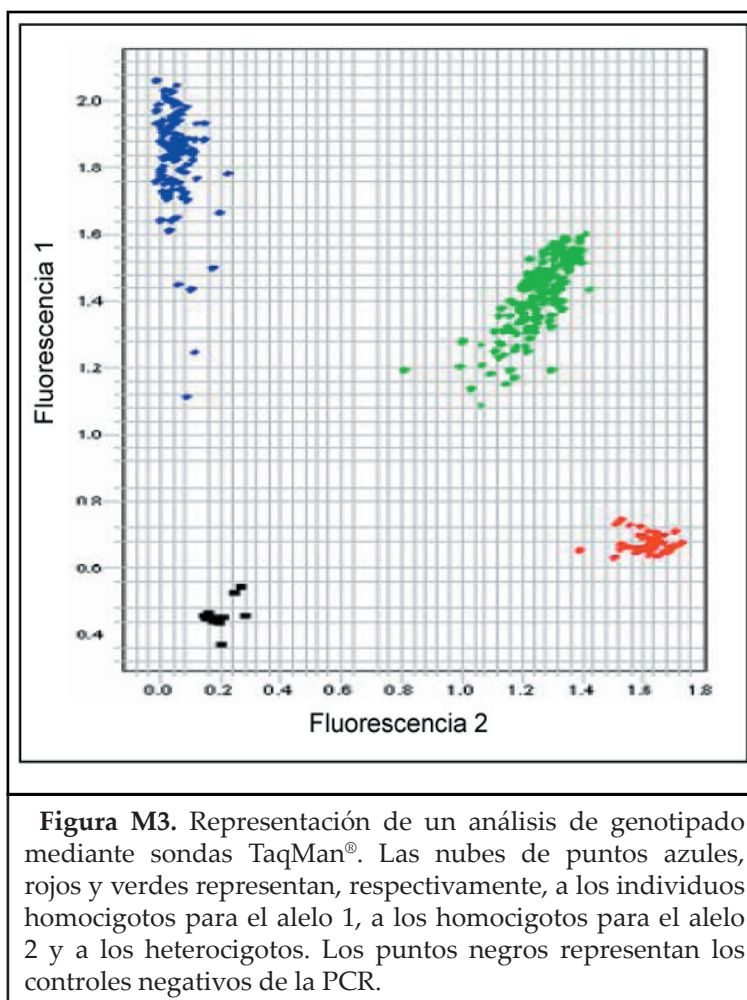
**Figura M2.** Representación teórica del funcionamiento de las sondas TaqMan®. Si la sonda está perfectamente hibridada al molde, cuando la polimerasa la alcanza la hidroliza, liberando la marca fluorescente y provocando así un aumento de la fluorescencia.

Estas sondas se pueden emplear para cuantificar el ADN presente en una muestra en PCR a tiempo real, pero también son muy útiles para genotipar con alto rendimiento. La



región genómica que incluye el SNP se amplifica en presencia de dos sondas TaqMan®, de forma que cada una de ellas hibrida perfectamente con uno de los alelos y su región flanqueante, y cada una de ellas con una marca fluorogénica diferente, de tal forma que la señal de cada una sólo se libera en presencia del alelo con el que la sonda hibrida, y no con el alelo con el que hay un desapareamiento (Ranade y cols. 2001). Tras el proceso de PCR-genotipificación se obtiene un gráfico como el mostrado en la Figura M3.

Esta técnica se empleó para analizar 49 SNPs, según las indicaciones del fabricante (Applied Biosystems<sup>TM</sup>). Los ensayos específicos para cada SNP (que incluyen oligonucleótidos y sondas) se diseñan de tal manera que todos funcionan en las mismas condiciones de PCR (condiciones universales). De esta manera, la mezcla de reacción, la “Universal PCR Master Mix, No AmpErase<sup>®</sup> UNG”, y el programa de PCR: desnaturalización inicial a 95°C 10 minutos y 40 ciclos de 95°C 15 sg y 60°C 1 minuto, es común para todos ellos. Una vez finalizada la PCR se realiza la discriminación alélica, detectando qué marca fluorescente ha sido liberada durante el proceso.



**Figura M3.** Representación de un análisis de genotipado mediante sondas TaqMan®. Las nubes de puntos azules, rojos y verdes representan, respectivamente, a los individuos homocigotos para el alelo 1, a los homocigotos para el alelo 2 y a los heterocigotos. Los puntos negros representan los controles negativos de la PCR.

#### 4.5. Plásmidos y clonajes

Los promotores amplificados se subclonaron en pcDNA3, de Invitrogen y posteriormente se clonaron en el plásmido pXP2 (donado por el Prof. Francisco Zafra) del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, sin actividad promotora *per se* (Nordeen 1988). El plásmido que se empleó como control en los experimentos de transfección transitoria fue la construcción pSV-β-galactosidasa, de Promega.

##### 4.5.1. Clonaje de la región promotora del gen *DDIT3* en un vector

Se amplificó por PCR la región correspondiente a los nucleótidos -1626 a +60 (tomando

como +1 el inicio de la transcripción) a partir de ADN genómico de un individuo que presentaba la forma alélica -1507C.

Los oligonucleótidos para la PCR -fabricados por Invitrogen- incluyeron sendas dianas de restricción para facilitar el clonaje creando tras la restricción sendos extremos cohesivos (indicadas como texto subrayado) y unas colas para facilitar el corte por la enzima de restricción de la diana (en minúsculas):

*DDIT3-Prom-Upper*: 5' cta gta gct tgg atC CGG CCT TGT GAC AGT TTC T 3'

*DDIT3-Prom-Lower*: 5' tat aca cta caa gct TGC CAC CCG CTC ATC TTT 3'

Los promotores se amplificaron en las siguientes condiciones de PCR (reactivos de Biotools, excepto los nucleótidos, de Applied Biosystems): 50ng de ADN genómico se incubaron con Tris HCl 75mM pH 9.0, Cl<sub>2</sub>Mg 1 mM, 1 unidad de Taq polimerasa, nucleótidos 200 µM y oligonucleótidos 0.8 µM, en un programa de PCR que incluía una desnaturalización inicial a 94°C 5 minutos, 40 ciclos de 94°C 30 sg, 55°C 30 sg y 72°C 1 minuto y una elongación final de 72°C 10 minutos, en el termociclador *GeneAmp PCR System 9600*, de Perkin Elmer.

Los productos amplificados se purificaron con el “*QIAquick® PCR Purification kit*”, de Qiagen, se sometieron a digestión enzimática durante 16 horas a 37°C en tampón 2 -New England Biolabs- con 10 unidades de *Bam*HI -New England Biolabs- y de *Hind*III y estos amplificados digeridos se purificaron de banda con el “*QIAquick Gel Extraction kit*”, de Qiagen.

Posteriormente, el promotor digerido y purificado se insertó en pcDNA3, que previamente había sido digerido y purificado de la misma manera que el promotor correspondiente, utilizando el “*Quick Ligation Kit*”, de New England Biolabs, según instrucciones recomendadas por el fabricante, 10 minutos a temperatura ambiente.

Se transformaron bacterias XL1-Blue competentes mediante choque térmico (42°C 30 segundos), y se crecieron en medio selectivo (LB: 5 gramos de extracto de levadura, 10 gramos de Triptona-Peptona -ambas de Difco- y 10 gramos de NaCl -Merck- por litro, con 100 µg/ml ampicilina -Roche-). El ADN plasmídico fue extraído de las bacterias transformadas empleando el kit “*Wizard® Plus SV Minipreps*”, de Promega.

Para subclonar las regiones promotoras en pXP2 se extrajeron mediante restricción desde pcDNA3 con las mismas condiciones y enzimas de restricción empleadas en los pasos anteriores, se purificó de banda y se ligaron en pXP2, también digerido y purificado de la manera ya descrita. Se transformaron bacterias competentes y el ADN plasmídico fue extraído de las mismas por el método ya descrito.

Una vez comprobada la secuencia para todas las construcciones, se realizaron MaxiPreps con el “*QIAGEN® Plasmid Purification kit*”, de Qiagen, según indicaciones del fabricante, para obtener una cantidad de plásmido suficiente para las posteriores transfecciones celulares.

El plásmido pXP2 tiene el sitio de clonaje en 5' al inicio de la secuencia codificante del gen de la luciferasa. Esta enzima cataliza una reacción que, en presencia de luciferina, genera emisión de fotones. Así, la actividad luciferasa se puede medir en un luminómetro que cuantifica el destello emitido, y de esta forma, la medida de la actividad luciferasa es un indicador cuantitativo de la actividad transcripcional de la región promotora clonada en el plásmido pXP2, que dirige su expresión.

#### 4.5.2. Generación del alelo 2 mediante mutagénesis dirigida

La otra variante alélica (-1507G) se obtuvo por mutagénesis dirigida con el “*QuickChange® Site-directed Mutagenesis kit*”, de Stratagene, según indicaciones del fabricante. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados se indica a continuación, señalando con subrayado la base a mutar (fabricados por Invitrogen):

*DDIT3-Mut-Upper*: 5' ACT TTG CAT TCT GGG TGG TGC GTT TT<sup>3'</sup>

*DDIT3-Mut-Lower*: 5' AAA ACG CAC CAC CCA GAA TGC AAA GT<sup>3'</sup>

El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 95°C 30 sg y 16 ciclos de 95°C 30 sg y 68°C 10 minutos en el mismo termociclador donde se realizó la PCR de la región promotora. Posteriormente se incubó el producto de PCR a 37°C durante 1 hora con *DpnI* para eliminar el plásmido original.

Se transformaron bacterias competentes y se purificó el ADN plasmídico de la misma manera ya descrita para la primera variante alélica.

La secuencia de todas las construcciones generadas fue comprobada en el servicio de Secuenciación del Parque Científico de Madrid (PCM).

#### **4.6. Líneas Celulares**

En la realización del trabajo se ha utilizado la línea celular de neuroblastoma humano SK-N-MC (*American Type Cultura Collection*, ATCC, ref. HTB-10). Se creció en monocapa sobre placas de cultivo de 10 cm de diámetro (P100, de Falcon) y se mantuvo en medio mínimo esencial (MEM -Gibco-), suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal -Sigma- descomplementado durante 30 minutos a 56°C, aminoácidos no esenciales (L-alanina 39.2 mg/l, L-asparagina·H<sub>2</sub>O 60 mg/l, L-ácido aspártico 53.2 mg/l, L-ácido glutámico 58.8 mg/l y L-prolina 46 mg/l, todos de Merck), L-glutamina 4 mM -Merck-, piruvato sódico 1 mM -Merck-, y gentamicina 50 µg/ml -Sigma-.

Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> al 7%.



#### 4.7. Transfección de células y medida de la actividad transcripcional

Los plásmidos generados se emplearon para la transfección transitoria y estable de células de neuroblastoma humano SK-N-MC.

##### 4.7.1. Transfección transitoria con las construcciones pXP2-DDIT3

El día previo a la transfección se siembran  $2 \times 10^5$  células por pocillo en una placa de 24 pocillos (M24, de Falcon). Se transfectan 0.7  $\mu\text{g}$  de ADN por pocillo mezclando los plásmidos pXP2-DDIT3 y pSV- $\beta$ -galactosidasa en una relación 1:1 (0.35  $\mu\text{g}$  de pXP2 y 0.35  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -gal) con Lipofectamina Plus (de Life Technologies), siguiendo las indicaciones del fabricante, en relación ADN:Lipofectamina 1:3 y dejando la incubación de las células con el plásmido 5 horas. A las 24 horas de la transfección se hace el tratamiento a las células para ver la respuesta al estímulo.

Para analizar las células transfectadas con construcciones que expresan luciferasa, tras lavar con Tampón Fosfato Salino (PBS) (8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 2.89 g/l  $\text{HNa}_2(\text{PO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  y 0.2 g/l  $\text{HK}(\text{PO}_4)$ , todo de Merck), se lisan las células con 200  $\mu\text{l}$  del kit “*Cell Culture Lysis Reagent*”, de Promega (25mM Tris pH 7.8 con  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 2 mM CDTA, 2 mM DTT, 10% glicerol y 1% Tritón X-100). Para facilitar la lisis se deja 10 minutos a temperatura ambiente y después se someten las células a un ciclo de congelación (mínimo 2 horas a  $-70^\circ\text{C}$ ) y descongelación a temperatura ambiente; para desechar los restos celulares grandes se centrifugan las muestras a 13.000 r.p.m. durante 10 minutos.

El lisado celular fue ensayado para las actividades  $\beta$ -galactosidasa, como indicador de la eficiencia de la transfección, y luciferasa, como indicador de la actividad transcripcional del promotor de *DDIT3*:

- Ensayo de actividad  $\beta$ -galactosidasa. Se incuban 50  $\mu\text{l}$  de lisado celular en una placa de E.L.I.S.A. con 50  $\mu\text{l}$  de sustrato de enzima (2mM  $\text{MgCl}_2$  -Merck-, 100 mM  $\beta$ -mercaptoetanol -Sigma-, 120 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 80 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  -ambos de Carlo Erba- y 1.33 mg/ml de ONPG (2-Nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido) -Sigma-). Esta reacción origina un producto coloreado cuya concentración se mide como absorbancia a 415 nm en un lector de placas de E.L.I.S.A. (Modelo 680, de BioRad).
- Ensayo de actividad luciferasa. Se miden 40  $\mu\text{l}$  de lisado celular añadiendo 100  $\mu\text{l}$  de reactivo de la enzima (20 mM Tricina, 1.07 mM  $\text{MgCO}_3$ , 33.3 mM DTT, 270  $\mu\text{M}$  Coenzima A -todo de Sigma-, 2.67 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.1 mM EDTA -ambos de Merck-, 470  $\mu\text{M}$  sal potásica de Luciferina -Promega- y 530  $\mu\text{M}$  ATP -Boehringer Mannheim-); alternativamente, se empleó el reactivo del kit *Luciferase Assay System* -Promega-. La emisión de luminiscencia se registra en un luminómetro Monolight 2010 (Analytical Luminiscence Laboratory).

La actividad transcripcional de ambas construcciones del promotor de *DDIT3* se expresa como la actividad relativa luciferasa/ $\beta$ -galactosidasa.

### 4.7.2. Transfección estable con las construcciones pXP2-DDIT3

Dos días antes de la transfección se siembran  $3 \times 10^6$  células en una placa de cultivo P100. Se mezclan los plásmidos pXP2-DDIT3 (construcciones -1507C o -1507G) y pcDNA3 en una relación 90:10 para transfectar 16  $\mu$ g de ADN (14.4  $\mu$ g de pXP2 y 1.6  $\mu$ g de pcDNA3) por placa con Lipofectamina Plus, según indicaciones del fabricante, en relación ADN: Lipofectamina 1:4, durante 5 horas.

Se recogen las células de la placa P100 mediante tripsinización (con una solución de tripsina 500 mg/l -Difco- y EDTA 160 mg/l -Merck-) y se siembran diluciones de la transfección 1/2, 1/10, 1/100 y 1/1000. Al día siguiente, y a partir de ahí cada 3 ó 4 días (2 veces en semana), se sustituye el medio por medio fresco con Geneticina 400  $\mu$ g/ml -Gibco- hasta obtener clones aislados resistentes al antibiótico.

Se recogen los clones por aspiración con una pipeta automática y se siembran en una M24 para su expansión. Se analiza la actividad luciferasa y mantenemos las líneas que presentan mayor actividad. Además, se realiza una normalización de la cantidad de construcción pXP2 en función del número de células. Para esto, se purifica el DNA celular de la mitad del volumen resultante de la lisis con el kit *High Pure PCR Template Preparation* y se realizan PCRs a tiempo real en el aparato *AbiPrism® 7900HT Sequence Detection System*, de Applied Biosystems en las condiciones universales de PCR indicadas por el fabricante. Se determina la cantidad de plásmido que hay en el extracto amplificando un fragmento del gen de la luciferasa con los oligonucleótidos 5'CCT TGA TTG ACA AGG ATG GAT GGC3' y 5'CAT CGT CGG GAA GAC CTG CCA CGC CC3' y se calcula su cantidad relativa en función del número de células. Para calcular este valor, se cuantifica la cantidad de 18S, constante en la célula mediante el ensayo de Applied Biosystems Hs99999901\_s1.

### **4.8. Tratamientos celulares**

Para inducir EO se emplea el sistema Xantina / Xantina-Oxidasa. (Xantina 10  $\mu$ M -Sigma- en NaOH 0.1mM -Merck- y Xantina-Oxidasa 50 mU/ml -Roche-), que produce liberación de aniones superóxido ( $O_2^-$ ).

Para inducir ERE se emplea Tunicamicina (2.5  $\mu$ g/ml en DMSO, todo de Sigma), que es un antibiótico producido por *Streptomyces lysosuperficus* que inhibe la N-glicosilación de las proteínas.

Para la convergencia de ambos estreses se añade el sistema Xantina / Xantina-Oxidasa

y Tunicamicina simultáneamente en las cantidades ya indicadas.

Los tratamientos se realizaron de manera puntual, recogiendo a un determinado punto (normalmente, 18 horas), o en cinéticas, recogiendo puntos durante 24 horas a intervalos de 3 horas.

#### **4.9. Análisis estadísticos**

Los análisis se realizaron empleando una hoja de cálculo (Microsoft Excel).

Las distribuciones de alelos y genotipos fueron analizadas mediante el test  $\chi^2$ . Cuando el test  $\chi^2$  fue significativo, esto es, con valor  $p < 0.05$ , la potencia de la asociación entre el polimorfismo y la EA fue estimada con el riesgo relativo (*Odds Ratio*, OR), con intervalos de confianza (IC) del 95%, siguiendo métodos descritos (Morris y cols. 1988).

Los posibles efectos del genotipo ApoE, la edad y el sexo sobre el riesgo asociado al polimorfismo en estudio se analizaron por estratificación. También se estratificó para obtener una primera estimación de la interacción entre genes y/o SNPs del mismo gen.

Para las asociaciones positivas, se realizaron estudios de regresión logística con el programa SPSS.

Para estudiar la actividad transcripcional de las regiones promotoras, se normalizó las cuentas de actividad luciferasa respecto a las miliunidades de actividad  $\beta$ -galactosidasa. Para calcular la significatividad de las diferencias encontradas en la actividad transcripcional se empleó el test estadístico “t de Student”.



---

## RESULTADOS

---



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Asociación genética

Con la finalidad de determinar si alguno de los 56 polimorfismos (SNPs) analizados tenían relevancia en el desarrollo de la EA, se llevó a cabo un estudio transversal caso - control empleando en primer lugar una muestra de población de España - Centro. Los SNPs para los que se encontró asociación estadísticamente significativa se analizaron en las muestras de réplica de España - Cataluña y/o de Canadá (la descripción de las muestras se presenta en el apartado 4.2 de “Materiales y Métodos”).

Se analizó la distribución de frecuencias de alelos y genotipos de cada polimorfismo con el fin de identificar posibles diferencias significativas en estas distribuciones entre el grupo de los casos y el grupo de los individuos controles. En todos los polimorfismos se comprobó que la distribución genotípica para las muestras control era la esperada según el equilibrio de Hardy-Weinberg (Test  $\chi^2$ , valor  $p > 0.05$ ).

La distribución de genotipos y los riesgos asociados a los alelos se presentan en el Anexo I y, de forma resumida, en la tabla R1, para la muestra de referencia (España-Centro) y las de réplica. Se recogen las distribuciones en las muestras completas y en los diferentes estratos poblacionales según los principales factores de riesgo: ser portadores o no del alelo ApoE  $\epsilon 4$  (representados respectivamente como ApoE4 + y ApoE4 -), el sexo y la edad de aparición de los síntomas de EA (estratificamos en edad “temprana”, de 40 a 64 años, “intermedia” de 65 a 85 y “tardía” de 86 en adelante). Para unificar las tablas, se muestra siempre el riesgo relativo (OR) del alelo 1 frente al alelo 2.

Si bien en las Tablas R1 y en la del Anexo I se recogen todos los datos correspondientes a todos los SNPs analizados, a continuación se comentan sólo aquellos genes para los que se observó algún SNP asociado con la EA de forma significativa (valor  $p < 0.05$ ) o con tendencia a la asociación ( $0.05 < \text{valor } p < 0.1$ ).

Se comentan también los riesgos y/o tendencias asociados a los genotipos cuando éstos resulten más interesantes que el análisis simplificado de los alelos.

Además, para aquellos polimorfismos para los que se observe alguna interacción con la edad de aparición de los síntomas de la EA, ésta se detalla junto con gráficas indicativas.

### **GENES RELACIONADOS CON LA INFECCIÓN POR *HERPES SIMPLEX VIRUS* TIPO I**

En este módulo hemos analizado polimorfismos en los genes *EIF2AK2*, relacionado con degeneración celular en respuesta a infecciones por virus con genoma tipo ARN de doble hebra, *PVRL2*, que codifica para uno de los receptores de herpesvirus y *TAP2*, relacionado con inmunoevasión del virus durante su proceso de infección.

- **EIF2AK2 (Kinasa 2 del factor 2 $\alpha$  de inicio de la traducción)**

En este gen analizamos tres polimorfismos, con identificaciones [rs2254958](#), localizado en la región 5'UTR, a 308 bases del inicio de la traducción; [rs4648174](#), localizado en el intrón 4; y [rs3770768](#), en el intrón 13.

Los dos primeros forman parte del mismo bloque haplotípico dentro de este gen: se encontraban ligados prácticamente al 100%, con un desequilibrio de ligamiento en la muestra general de valor  $d=0.12$ . Por consiguiente, solamente se detallará el análisis del [rs2254958](#), puesto que los resultados obtenidos en el [rs4648174](#) fueron una réplica de los obtenidos en el primero.

El tercer SNP forma parte de otro bloque haplotípico de este gen, y no presenta desequilibrio de ligamiento con los anteriores.

- [rs2254958](#).

*Muestra de España - Centro.* La frecuencia del alelo 1 (T) en los casos se encuentra disminuida respecto a los controles, indicando una protección asociada a este alelo ( $OR=0.72$ ,  $IC(95\%)$  (0.57 – 0.92),  $p=0.007$ ).

Este efecto estaba más acentuado en los individuos portadores de ApoE4 ( $OR=0.60$  (0.38 – 0.95),  $p=0.03$ )

Estratificando la población en función de la edad de aparición de los síntomas, se puede apreciar una interacción de este SNP con la edad, en cuanto a que observamos que en los individuos de aparición temprana la protección es significativa ( $OR=0.56$  (0.36 – 0.90),  $p=0.02$ ), en intermedios se observa como una tendencia ( $OR=0.76$  (0.56 – 1.03),  $p=0.08$ ) y en tardíos no es significativa ( $OR=0.72$  (0.35 – 1.49),  $p=0.37$ ).

En resumen, el análisis de la muestra de referencia sugería una asociación del alelo 2 (C) con la EA, posiblemente dependiente del genotipo ApoE y de la edad.

*Muestra de España - Cataluña.* Aunque también se observaba en esta muestra un ligero incremento en la frecuencia del alelo 1 en los controles, no se alcanzaban asociaciones significativas en la muestra general ni en los diferentes estratos.

*Muestra de Canadá.* En esta muestra, la distribución genotípica sí era muy similar a la de referencia. Del mismo modo que ya indicamos en aquella, la frecuencia del alelo 1 (T) en los controles estaba aumentada respecto a los casos ( $OR=0.82$  (0.60 – 1.17),  $p=0.3$ ), si bien el efecto protector de este alelo no era significativo, posiblemente debido al menor tamaño muestral.

También se observó que, como en la de referencia, la protección del alelo 1 estaba restringida a los individuos más jóvenes de la muestra.

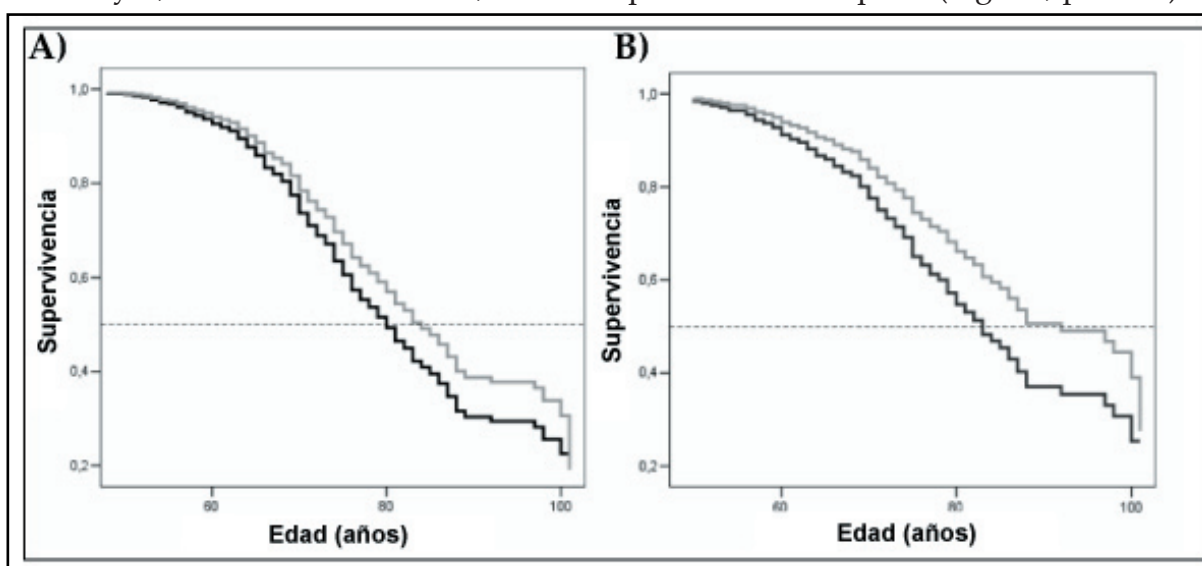


*Muestra combinada.* Puesto que las distribuciones de genotipos eran muy similares en las muestras de España - Centro y en la de Canadá, ambas muestras se combinaron, observando que entonces la protección asociada al alelo 1 era muy significativa ( $OR=0.77$  ( $0.64 - 0.92$ ),  $p=0.005$ ).

Para estudiar más detalladamente el aparente efecto de este polimorfismo en relación con la edad de aparición de los síntomas de la EA, se utilizaron análisis de supervivencia de Kaplan-Meier y modelos de regresión de Cox, tanto en las muestras individuales (datos no mostrados) como en la combinada, cuyos resultados se comentan a continuación.

En la muestra combinada, la media de la edad de aparición de los síntomas ( $\pm$  el error estándar) fue de  $74.1 \pm 0.7$ ,  $76.1 \pm 0.57$  y  $77.1 \pm 0.9$  años para los genotipos CC, CT y TT, respectivamente. El adelanto en la edad de aparición de los síntomas de los homocigotos CC era significativo en los no portadores de ApoE4 ( $74.9 \pm 0.9$ ,  $78.1 \pm 0.6$  y  $78.2 \pm 0.9$  años, respectivamente), pero no en los portadores ( $72.4 \pm 1.1$ ,  $72.3 \pm 0.9$  y  $74.3 \pm 1.7$ ) años. Esta aparente ausencia de efecto en los portadores de ApoE4 probablemente se debe a que el adelanto asociado a ApoE4 es muy fuerte y enmascara el efecto del polimorfismo de *EIF2AK2*.

En las curvas de supervivencia de Cox, se observa que el 50% de supervivencia (edad a la que el 50% de la muestra permanece como individuos sanos) se encuentra 1.5 años antes en individuos CC que en portadores del alelo T -los genotipos CT y TT se unieron por tener un efecto similar- (ver Figura R1, panel A), y que esta diferencia es mayor, alrededor de 3.3 años, en los no portadores de ApoE4 (Fig. R1, panel B).



**Figura R1.** Representación derivada del modelo de Cox de la edad de aparición de los síntomas de EA en función del genotipo rs2254958 del gen *EIF2AK2*. Las curvas de supervivencia representan la frecuencia de individuos que se mantienen como controles en la edad indicada en función del modelo de Cox, en toda la muestra (panel A) y en no portadores de ApoE4 (panel B). En línea negra, genotipo CC, y en gris, CT+TT. La línea de puntos horizontal indica el 50% de supervivencia.

La asociación de este polimorfismo de *EIF2AK2* con la EA está publicada en el artículo adjuntado como Anexo II-E, (Bullido y cols. 2007b).

- [rs3770768](#).

*Muestra de España - Centro.* Si bien en la muestra general la distribución de alelos y genotipos no mostraba ninguna asociación ni tendencia, en los individuos no portadores de ApoE4, la frecuencia del alelo 1 (C) está ligeramente incrementada en los casos respecto a los controles, indicando una tendencia de riesgo asociada a este alelo 1 (OR=1.80 (0.96 – 3.36), p=0.06).

*Muestra de España - Cataluña.* La frecuencia y distribución de alelos y genotipos no mostró ninguna tendencia ni asociación significativa con la EA.

### • PVRL2 (Receptor Similar al de Poliovirus 2)

En este gen analizamos dos polimorfismos, con identificaciones [hCV11711387](#) (base de datos de Celera), localizado en la región promotora, posición -7004, que consideramos interesante porque según su localización parecía encontrarse en una región reguladora de la actividad promotora, y [rs3745150](#), localizado en 3' del gen, a +3564 de la parada de la traducción, en un bloque haplotípico diferente al del polimorfismo anterior. Como se trata de un gen cuyo locus está próximo al de *APOE*, estudiamos en primer lugar si los SNPs seleccionados mostraban desequilibrio de ligamiento con los alelos de *APOE* ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$ ), puesto que, en caso de que se diera dicho desequilibrio, los resultados obtenidos podrían deberse al efecto de ApoE4.

- [hCV11711387](#). Este polimorfismo no se encontraba ligado a los del gen *APOE*.

*Muestra de España - Centro.* Si bien estudiando la frecuencia de los alelos no se encontraba ninguna asociación ni tendencia, en la muestra general se observó una tendencia de riesgo en los homocigotos para el alelo 1 (T) respecto a los individuos portadores del alelo 2 (C) (OR=2.85 (0.85 – 9.56), p=0.07), aunque el número de individuos homocigotos 11 era muy bajo (8 casos y 4 controles).

*Muestra de España - Cataluña.* No se replicaron los resultados obtenidos en la muestra de referencia.

- [rs3745150](#). Este polimorfismo mostraba un fuerte desequilibrio de ligamiento con el alelo  $\epsilon 4$  de *APOE*, por lo que para el estudio descartamos los individuos portadores de este alelo, y analizamos la asociación sólo en los no portadores de ApoE4.

*Muestra de España - Centro.* Se observó un efecto protector del alelo 1 (G) (OR=0.75 (0.56 – 1.00), p=0.051), más acentuado en los individuos con edad temprana de aparición de los síntomas (OR=0.38) (0.22 – 0.67), p=0.0007.

Además, respecto al sexo, pudimos observar diferencia en los distintos estratos: la protección asociada al alelo G estaba restringida al grupo de los varones (OR=0.61 (0.37 – 1.01),  $p=0.05$ ), donde la distribución genotípica indicaba que el efecto protector estaba más acentuado en los individuos portadores de este alelo respecto a los homocigotos para el alelo 2 (C) (OR=0.42 (0.19 – 0.95),  $p=0.03$ ).

*Muestra de España - Cataluña.* No se observaba asociación significativa en la muestra general de no portadores de ApoE4, ni en los más jóvenes, aunque esta falta de réplica pudiera estar debida al bajo número de individuos jóvenes no portadores de ApoE4 (6 casos).

En cuanto al sexo se observaba, igual que en la muestra de referencia, que en los varones el alelo 1 era más frecuente en los controles que en los casos, con un efecto protector también más acentuado al comparar portadores del alelo 1 frente a homocigotos para el alelo 2, aunque la diferencia no alcanzaba significatividad en ninguna de estas comparaciones.

*Muestra combinada.* Como los varones de ambas muestras mostraban distribuciones genotípicas similares, se combinaron y se observó que el alelo G mostraba el efecto protector descrito en las muestras individuales (OR=0.68 (0.47 – 0.97),  $p=0.03$ ), más acentuado al comparar los individuos portadores del alelo G respecto a los homocigotos CC (OR=0.49 (0.28 – 0.88),  $p=0.02$ ).

Por tanto, los resultados obtenidos indican que el polimorfismo [rs3745150](#) del gen *PVRL2* modula la susceptibilidad para la EA en varones, al menos en ausencia del alelo ApoE4.

#### • *TAP2* (Transportador 2 Asociado al Procesamiento de Antígenos)

El gen *TAP2* se encuentra en la región del Complejo Principal de Histocompatibilidad, por lo que presenta una gran variabilidad y tiene numerosos haplotipos [http://www.anthonynolan.com/HIG/nomen/nomen\\_index.html](http://www.anthonynolan.com/HIG/nomen/nomen_index.html). Los haplotipos mayoritarios son TAP2A (TAP2\*0101), definido por Thr en el codón 665 y Stop en el 687, que da lugar a una proteína de 686 aminoácidos y TAP2B (TAP2\*0201), definido por Ala en el codón 665 y Gln en el 687, que da lugar a una proteína de 703 aminoácidos. Los dos polimorfismos estudiados en este gen, con identificaciones [rs241447](#) (Ala665Thr) y [rs241448](#) (Gln687Stop), se encuentran ligados prácticamente al 100%, de forma que el estudio de uno u otro puede emplearse como marcador de haplotipo, que es el que vamos a analizar como factor de riesgo para la EA.

○ Haplotipo TAP2A / TAP2B.

*Muestra de España - Centro.* Observamos que el haplotipo TAP2B es más frecuente en los casos que en los controles, indicando un riesgo asociado al mismo (OR=1.46 (1.12 – 1.91),  $p=0.005$ ). El riesgo era mayor al comparar los individuos homocigotos para TAP2B con los portadores de TAP2A (OR=2.06 (1.12 – 3.81),  $p=0.018$ ).

Al estratificar la muestra, se observaba que la tendencia era la misma en todos los estratos (riesgo asociado al haplotipo TAP2B, especialmente en homocigosis), aunque estaba más acentuada en los individuos de edad temprana de aparición de los síntomas (OR=1.87 (1.09 – 3.21),  $p=0.02$ ) respecto a los de edad intermedia y tardía, y en los portadores de ApoE4 (OR=1.81 (1.03 – 3.19),  $p=0.03$ ).

*Muestra de España - Cataluña.* Si bien en la muestra general no se observó ningún riesgo ni tendencia asociado a este polimorfismo, en los individuos portadores de ApoE4 se observa, igual que en la muestra de referencia, que los homocigotos para el haplotipo TAP2B son más frecuentes en los casos que en los controles, aunque la diferencia no alcanzaba la significatividad estadística.

*Muestra de Canadá.* Se comportaba de un modo similar a la de referencia: en la muestra general ya que se observaba un riesgo elevado en los individuos homocigotos para TAP2B (OR=2.90 (1.14 – 7.35),  $p=0.02$ ) y al estratificar por ApoE4 el efecto era más acusado en los portadores (OR=7.29 (1.39 – 38.31),  $p=0.01$ ).

*Muestra combinada.* Al combinar las muestras de España - Centro y de Canadá observamos que el riesgo asociado a la homocigosis para TAP2B se hacía muy significativo (OR=2.30 (1.3 – 3.72),  $p=0.002$ ), y este riesgo se acentuaba en los portadores de ApoE4 (OR=4.67 (1.35 – 16.18),  $p=0.009$ ).

En resumen, este estudio indicaba que la homocigosis para TAP2B, junto con ser portador de ApoE4, es un fuerte factor de riesgo para la EA, tal como se recoge en el artículo adjuntado como Anexo II-D (Bullido y cols. 2007a).

### **GENES INDUCIDOS POR ESTRÉS OXIDATIVO**

En un *microarray* de expresión de células tratadas con Xantina / Xantina-Oxidasa, que es el modelo celular de Estrés Oxidativo crónico puesto a punto en el laboratorio (Vicente Cenzano 2007), se encontraban entre los 10 más sobreexpresados los genes *PLA2G3*, de la familia de las fosfolipasas  $A_2$ , consideradas protectoras frente al daño oxidativo, y *HMGCR*, gen clave en el metabolismo del colesterol

### • PLA2G3 (Fosfolipasa A<sub>2</sub> del Grupo 3)

En este gen se analizaron siete polimorfismos, cuatro de regiones reguladoras y tres generadores de cambio de aminoácido, si bien estos últimos no mostraron asociación con la EA. Las identificaciones de los polimorfismos para los que se observó alguna asociación, y su localización en el gen son: [rs3788428](#), [rs9619169](#), [rs2232170](#) (del promotor, posiciones -940, -749 y -529, respectivamente) y [rs740231](#) (de la región 3'UTR, posición +558).

El primer SNP no se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el resto, que sí están parcialmente ligados entre sí: entre [rs9619169](#) y [rs2232170](#), observamos un valor  $d=0.06$ ; entre [rs9619169](#) y [rs740231](#), el valor  $d=0.04$ ; entre [rs2232170](#) y [rs740231](#), el valor  $d=0.02$ .

#### ○ [rs3788428](#).

*Muestra de España - Centro.* En los individuos portadores de ApoE4, la distribución de alelos y genotipos indicaba una tendencia a la asociación con la EA del alelo 1 (C) (OR=3.42, (0.77 – 15.15,  $p=0.086$ ).

#### ○ [rs9619169](#).

*Muestra de España - Centro.* La distribución de alelos mostraba una mayor frecuencia del alelo 1 (C) en los casos respecto a los controles, indicando una tendencia a la asociación de este alelo con la EA (OR=1.23 (0.98 – 1.54),  $p=0.078$ ). Este efecto se podía observar más acentuado al comparar los individuos portadores del alelo 1 frente a los homocigotos para el alelo 2 (genotipo AA) (OR=1.83 (1.21 – 2.77),  $p=0.004$ ).

Aunque este efecto se observaba en todos los estratos de la muestra, era mayor y muy significativo en los individuos con edad de aparición de los síntomas temprana (OR=4.32 (1.79 – 10.47),  $p=0.006$ ),

*Muestra de España - Cataluña.* De forma similar a lo observado en la muestra de referencia, los portadores de alelo 1 eran más frecuentes en los casos que en los controles, a pesar de que la diferencia no alcanzaba la significatividad estadística en la muestra general ni en los diferentes estratos.

*Muestra de Canadá.* También en esta muestra se observó que los portadores de alelo 1 eran más frecuentes en los casos que en los controles, indicando así un riesgo asociado a ser portador de este alelo (OR=2.34 (1.13 – 4.84,  $p=0.02$ ).

*Muestra combinada.* Al combinar las tres muestras se podía observar un riesgo pequeño pero muy significativo asociado a los individuos portadores del alelo 1 (OR=1.64 (1.26 – 2.14),  $p=0.003$ ).

En resumen, los datos sugieren fuertemente que el alelo 1 (C) del polimorfismo [rs9619169](#), en el promotor de *PLA2G3*, es un factor de riesgo para la EA, ya que la observación se replicó en las tres muestras de estudio.

○ [rs2232170](#).

*Muestra de España - Centro.* Pudimos observar una tendencia de riesgo asociada al alelo 1 (C) (OR=1.29 (0.95 – 1.74),  $p=0.10$ ), que era ligeramente mayor en los individuos no portadores de ApoE4 (OR=1.40 (0.94 - 2.10),  $p=0.10$ ), y en los individuos con edad temprana de aparición de los síntomas de la EA (OR=1.79, (0.99 – 3.25),  $p=0.053$ ).

*Muestra de España - Cataluña.* En la muestra general se observó la misma tendencia, asociada al alelo 1 (1.29 (0.94 – 1.77),  $p=0.12$ ), aunque no era significativa. Del mismo modo que ya indicamos en la muestra de referencia, este efecto estaba más marcado para los individuos no portadores de ApoE4 (OR=1.40 (0.94 – 2.10),  $p=0.099$ ).

*Muestra de España combinada.* Al combinar las dos muestras españolas, la tendencia observada en cada una de ellas se observaba como un riesgo significativo (OR=1.28 (1.03 - 1.58),  $p=0.02$ ), más acentuado en no portadores de ApoE4 (OR=1.40 (1.06 - 1.85),  $p=0.02$ ), y en mujeres (OR=1.36 (1.04 – 1.79),  $p=0.02$ ).

*Muestra de Canadá.* Inversamente a lo observado en las otras muestras analizadas, en la muestra general se observó una tendencia protectora asociada al alelo 1 (OR=0.68 (0.45 – 1.03),  $p=0.07$ ), que era estadísticamente significativa en los individuos no portadores de ApoE4 (OR=0.56 (0.34 – 0.92),  $p=0.02$ ).

Con el fin de analizar la discrepancia de resultados de la muestra canadiense frente a las españolas en este polimorfismo, y teniendo también en cuenta que en el otro polimorfismo del promotor ([rs9619169](#)) las tres muestras mostraban resultados similares, y que los dos polimorfismos estaban ligados en la muestra de referencia, analizamos el desequilibrio de ligamiento de los dos polimorfismos en las tres muestras.

Interesantemente, encontramos que, mientras que en las dos muestras españolas los polimorfismos [rs9619169](#) y [rs2232170](#) estaban ligados ( $d= 0.06$  y  $0.05$  para las muestras de Madrid y Cataluña, respectivamente), no había ligamiento en la de Canadá ( $d=0.001$ , no significativo), posiblemente por ser un grupo de población diferente a la española.

Estos resultados, por tanto, sugieren que el SNP [rs9619169](#) de *PLA2G3* está asociado con la EA, y que el [rs2232170](#) actúa como un marcador del anterior debido a su desequilibrio de ligamiento con él, siendo ésta la posible razón por la que la muestra de Canadá, en la que no hay ligamiento, difiere de las españolas.



○ [rs740231](#).

*Muestra de España - Centro.* En la muestra general se observó un pequeño riesgo no significativo asociado al alelo 1 (A) que se acentuó en el estrato poblacional de los individuos no portadores de ApoE4 (OR=1.35, (0.97 – 1.86),  $p=0.07$ ) y en el estrato poblacional de individuos con edad temprana de aparición de los síntomas de la EA (OR=1.68, (1.00 – 2.83),  $p=0.05$ ).

Los resultados de este estudio indican, en resumen, que polimorfismos en el promotor de PLA2G3 están asociados con riesgo para la Enfermedad de Alzheimer, siendo el SNP [rs9619169](#) (en la posición -749) el que daba resultados más consistentes.

• **HMGCR (3-Hidroxy-3-MetilGlutaril-CoenzymaA Reductasa)**

En este gen analizamos dos polimorfismos, con identificaciones [rs3761740](#), del promotor, posición -966, y [rs5909](#), de la región 3'UTR, posición +8. Pudimos observar que ambos se encontraban ligados prácticamente al 100%, con un desequilibrio de ligamiento con valor  $d=0.04$ , por lo que solamente detallaremos uno de ellos.

○ [rs5909](#).

*Muestra de España - Centro.* Aunque en la muestra general se observaba un ligero incremento en la frecuencia del alelo 1 (G) en los casos (OR=1.17), éste sólo era significativo en los portadores de ApoE4 (OR=1.99 (0.98 – 4.07),  $p=0.05$ ).

*Muestra de España - Cataluña.* Se observó un riesgo asociado al alelo 1 (OR=1.59 (1.07 – 2.36),  $p=0.02$ ).

*Muestra de Canadá.* Se pudo observar, al igual que en las otras dos, que la frecuencia del alelo 1 en los casos estaba incrementada respecto a los controles, aunque la diferencia no alcanzaba significatividad estadística (OR=1.40 (0.78 - 2.52),  $p=0.26$ ).

*Muestra combinada.* Como los resultados de asociación obtenidos en la población general de las tres muestras iban en el mismo sentido, esto es, riesgo asociado al alelo 1, se combinaron para aumentar el poder estadístico. En este caso pudimos observar que el riesgo asociado al alelo 1 sí alcanzaba significatividad (OR=1.35 (1.05 – 1.74),  $p=0.02$ ).

**GENES INDUCIDOS POR ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO**

En un *microarray* de expresión de células tratadas con Tunicamicina, modelo de Estrés del Retículo Endoplásmico puesto a punto en el laboratorio (Vicente Cenzano 2007), se vio sobreexpresión en los genes *DDIT3* (codifica para un factor de transcripción), *EIF2AK3* (codifica para la kinasa del factor  $EIF2\alpha$  que se activa en respuesta a sobrecarga del RE), *DNAJB9*, *HSPA5* (ambos codifican para chaperonas) y *HYOU1* (codifica para la proteína 1 sobrerregulada por hipoxia, de la familia de las chaperonas *Heat Shock Protein 70*).

- ***DDIT3* (Tránsito 3 Inducible por Daño en el ADN)**

En este gen analizamos un polimorfismo del promotor, con identificación [rs3847699](#), situado en la posición -1507.

- [rs3847699](#).

*Muestra de España - Centro.* Si bien en la muestra general no se observaban asociaciones ni tendencias, en el estrato de individuos con edad tardía de aparición de los síntomas, la frecuencia del alelo 1 (C) en los casos estaba disminuida respecto a los controles, indicando una tendencia protectora del mismo frente a la EA (OR=0.47 (0.19 – 1.15),  $p=0.09$ ).

Al observar la distribución por genotipos en este mismo estrato, se puede observar protección significativa de los individuos homocigotos CC respecto a los portadores del alelo 2 (G) (OR=0.34 (0.12 – 0.94,  $p=0.04$ ).

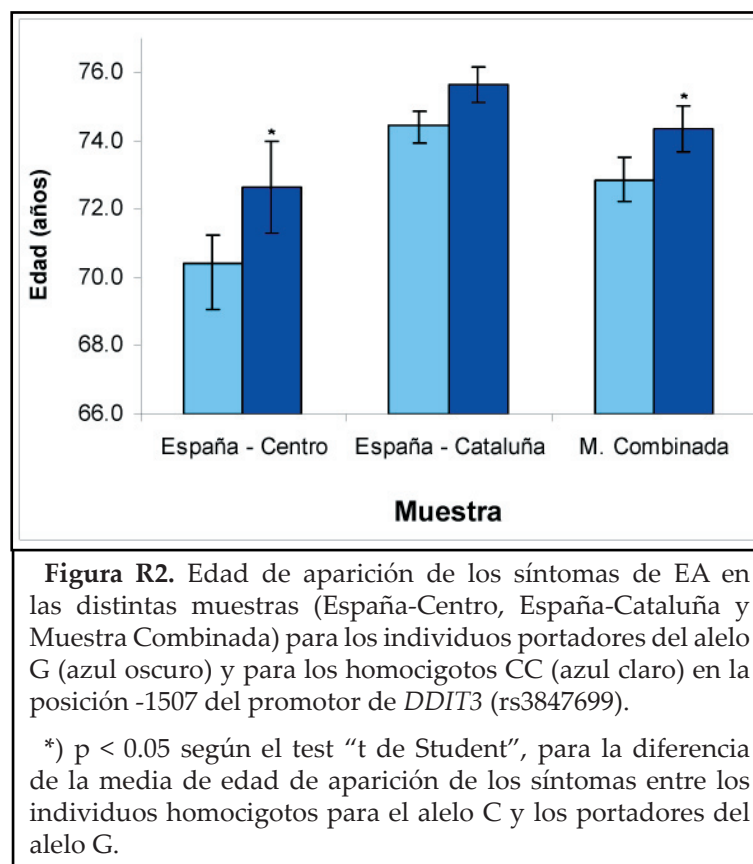
Además de esta asociación, se pudo observar un efecto de este SNP sobre la edad de aparición de los síntomas de la EA, ya que los individuos portadores del alelo G tenían una media de edad de aparición de los síntomas mayor que los individuos homocigotos CC ( $72.64 \pm 1.34$  y  $69.71 \pm 0.80$ , respectivamente, media  $\pm$  error estándar).

*Muestra de España - Cataluña.* Al igual que ocurría en la muestra de referencia, se observó un efecto de este polimorfismo sobre la edad de aparición de los síntomas, ya que los individuos portadores del alelo G tenían un retraso ligero pero significativo en la edad de inicio de la EA respecto a los individuos homocigotos CC ( $75.67 \pm 0.52$  y  $74.53 \pm 0.40$ , respectivamente).

*Muestra Combinada.* Al estudiar el efecto de este polimorfismo sobre la edad de aparición de los síntomas, el adelanto de la edad en los individuos portadores del alelo G respecto a los homocigotos CC se mantenía significativo ( $74.34 \pm 0.66$  y  $72.53 \pm 0.66$ , respectivamente).



En la Figura R2 podemos ver una representación gráfica de estos cambios en la edad de aparición de los síntomas en función de ser o no portador del alelo G en este sitio polimórfico.



#### • *DNAJB9* (Homólogo a DnaJ (HSP40), subfamilia B, miembro 9)

En este gen analizamos un polimorfismo de la región promotora, en la posición -783, con identificación [rs2227272](#).

##### ○ [rs2227272](#).

*Muestra de España- Centro.* Aunque en la muestra general no se observó ninguna asociación con la EA, al estratificar según la edad de aparición de los síntomas, en los individuos con edad temprana de aparición de los síntomas se observa que la frecuencia del alelo 1 (T) está incrementada en los casos frente a los controles, indicando una asociación de este alelo con la EA (OR=2.32 (1.10 – 4.89),  $p=0.02$ ).

#### • *HYOU1* (Proteína 1 Sobre-regulada por Hipoxia)

En este gen analizamos dos polimorfismos, con identificación [rs13929](#), de la región 3'UTR, en la posición +550, y [rs1003081](#), en 3' del gen, posición +907, que se encontraban en regiones posiblemente reguladoras de la expresión o de la estabilidad

o procesamiento el ARN mensajero. Estos polimorfismos se encuentran ligados prácticamente al 100%, con un desequilibrio de ligamiento de valor  $d=-0.11$ , de modo que a continuación solamente detallaremos el primero de ellos.

- o [rs13929](#).

*Muestra de España - Centro.* Se observaba una tendencia general a la asociación de la EA con el alelo 1 (C), aunque la significatividad estadística solamente se alcanzó en las mujeres.

En este estrato, se observaba que la frecuencia del alelo 1 está ligeramente incrementada en los casos respecto a los controles, mostrando una tendencia de riesgo de EA asociada a este alelo ( $OR=0.76$  ( $0.56 - 1.03$ ),  $p=0.08$ ). La protección estaba más acentuada y era un poco más significativa al comparar a los portadores del alelo 1 frente a las homocigotas para el alelo 2 (G) ( $OR=0.60$  ( $0.34 - 1.05$ ),  $p=0.07$ ).

### GENES RELACIONADOS CON LA RESPUESTA INTEGRADA A ESTRÉS

En un *microarray* de expresión de células tratadas simultáneamente con Xantina / Xantina-Oxidasa y con Tunicamicina, modelo de Respuesta Integrada a Estrés puesto a punto en el laboratorio (Vicente Cenzano 2007), además de ver que los genes que se sobreexpresaban en el modelo de ERE estaban aún más sobreexpresados en este modelo, especialmente *DDIT3*, se vio sobreexpresión específica de este modelo en el gen *MAP1LC3B* (relacionada con procesos de autofagia).

#### • *MAP1LC3B* (Cadena ligera 3 $\beta$ de la proteína 1 Asociada a Microtúbulos)

En este gen analizamos dos polimorfismos, uno de la región promotora, en la posición -740, con identificación [rs11117269](#), y otro de la región 3'UTR, en la posición +405, con identificación [rs9903](#), cada uno de un bloque haplotípico del gen. Pudimos observar asociación con la EA en el primer SNP pero no en el segundo.

- o [rs11117269](#).

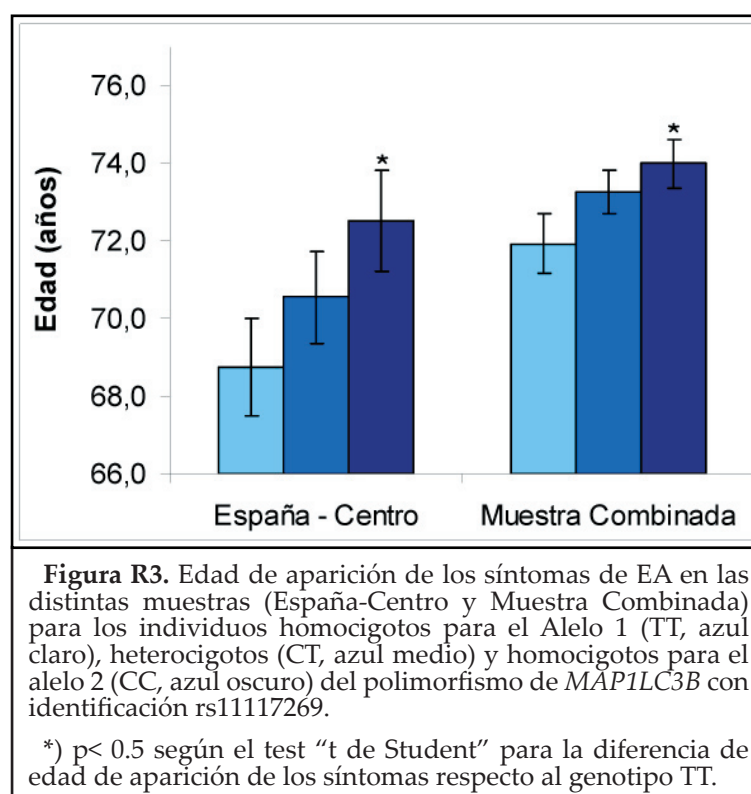
*Muestra de España- Centro.* Si bien la frecuencia de los alelos no indicaba ningún riesgo ni tendencia, analizando la distribución genotípica se observaba que la frecuencia de los homocigotos del alelo 2 (C) estaba aumentada en los casos respecto a los controles, indicando una protección para la enfermedad en los portadores del alelo 1 (T) frente a homocigotos CC ( $OR=0.64$  ( $0.45 - 0.91$ ),  $p=0.01$ ).

*Muestra de España - Cataluña.* Al igual que en la muestra de referencia, los individuos homocigotos CC eran más frecuentes en los casos que en los controles, indicando una protección de los individuos portadores del alelo T, aunque estos resultados no

alcanzaban la significatividad estadística (OR=0.57 (0.53 - 1.1),  $p=0.17$ ).

*Muestra combinada.* Al combinar ambas muestras se observó que los individuos portadores del alelo T tenían una protección muy significativa frente a padecer la enfermedad (OR=0.69 (0.54 – 0.89),  $p=0.005$ ).

Por otro lado, pudimos observar un efecto de este SNP sobre la edad de aparición de los síntomas: parecía que se iba retrasando en función de la dosis alélica del alelo C, observando diferencia significativa según el test de la t de Student entre los individuos homocigotos TT y los homocigotos CC, tanto en la muestra combinada como en la de referencia (Figura R3).



### GENES INDUCIDOS POR ESTRÉS ADRENÉRGICO

Para simular el efecto del estrés adrenérgico, en el laboratorio se utilizaban células SK-N-MC tratadas con el agonista Isoproterenol o con Forskolina, activador de la Adenilato Ciclasa. El estudio de *microarrays* de expresión de estas células tratadas comparadas con células control mostró una serie de genes sobreexpresados (Ramos Martín 2004): *ARID41* (codifica para la proteína 1 de Unión a la Proteína del Retinoblastoma), *CAPN9* (codifica para la Calpaína 9), e *IFT74* (Homólogo del Transportador Intraflagelar 74). Se vio represión en la expresión de *TMC5* (Proteína 5 Transmembrana Tipo Canal). Además, nos pareció de interés el gen *DSC1* (codifica para la Desmocolina 1), porque se sobreexpresaba tanto con activación adrenérgica como por activación de la Adenilato Ciclasa.

• **ARIDA4 (Dominio 4A Interactivo Rico en AT)**

Se analizó el polimorfismo con identificación [rs1051858](#), que genera un cambio de aminoácido Ala779Thr.

- [rs1051858](#). *Muestra de España- Centro*. La frecuencia del alelo 1 (G, Ala) en el estrato poblacional de individuos con edad de aparición tardía era menor en los casos que en los controles, indicando una ligera tendencia protectora del mismo frente a la EA (OR=0.45 (0.19 – 1.07), p=0.07).

• **TMC5 (Proteína 5 Transmembrana Tipo Canal)**

Se analizó el polimorfismo con identificación [rs2245086](#), situado en una posible región reguladora de la estabilidad o procesamiento del mensajero, 3'UTR, en la posición +45.

- [rs2245086](#).

*Muestra de España- Centro*. Si bien estudiando la distribución de los alelos no se encontraba ningún riesgo ni tendencia, al estudiar los genotipos se observó que los individuos portadores del alelo 1 (T) tenían una tendencia protectora para la EA respecto a los individuos homocigotos para el alelo 2 (C) (OR=0.43 (0.16 – 1.12), p=0.08), aunque esta observación no se replicaba en la muestra de España - Cataluña.

• **DSC1 (Desmocolina 1)**

Se analizó el polimorfismo con identificación [rs1789072](#), situado en el intrón 15.

- [rs1789072](#).

*Muestra de España - Centro*. La frecuencia del alelo 1 (A) en varones se encuentra incrementada en los casos respecto a los controles, indicando una asociación muy significativa con la EA de este alelo muy significativa (OR=2.28 (1.31 – 3.95), p=0.003). La distribución de genotipos mostró que el riesgo está asociado al genotipo homocigoto AA (OR=2.60 (1.40 – 4.80), p=0.002).

Además, se puede observar una tendencia al riesgo asociada al mismo alelo en el estrato poblacional de individuos no portadores de ApoE4 (OR=1.43 (0.95 – 2.15), p=0.08 para el alelo A y OR=1.53 (0.97 – 2.43), p=0.07 para el genotipo AA, respectivamente).

*Muestra de España - Cataluña*. Se replicaron los datos observados en la muestra de referencia: la frecuencia del alelo 1 (A) en varones se encontraba incrementada en

los casos respecto a los controles, indicando un riesgo asociado con la EA al alelo 1 estadísticamente significativo (OR=1.83 (1.09 – 3.05),  $p=0.02$ ), y asociado al genotipo homocigoto AA (OR=2.03 (1.11 – 3.70),  $p=0.02$ ).

También se replicó la observación de que había una tendencia a la asociación en los no portadores de ApoE4 (OR=1.39 (0.95 – 2.03),  $p=0.09$  para el alelo A y OR=1.48 (0.95 – 2.31),  $p=0.08$  para el genotipo AA).

*Muestra combinada.* Puesto que las frecuencias genotípicas eran similares en ambas muestras, se combinaron para aumentar el poder estadístico de las mismas. En esta muestra combinada, el riesgo asociado al alelo 1 en los varones era muy significativo (OR=2.00 (1.38 – 2.90),  $p=0.0002$ ), especialmente en los individuos homocigotos AA (OR=2.27 (1.48 – 3.47),  $p=0.0001$ ). También se hacía significativa la asociación con la enfermedad en los no portadores de ApoE4 del alelo A y del genotipo AA (OR=1.37,  $p=0.02$  y OR=1.47,  $p=0.016$ , respectivamente).

Estos resultados, que indican que *DSC1* está asociado con la EA de forma dependiente del sexo, están publicados en el artículo adjuntado como Anexo II-C, (Ramos y cols. 2006).

### **GENES INDUCIDOS POR SOBREEXPRESIÓN DE APP**

El análisis de un modelo celular del laboratorio que expresa de forma estable niveles elevados de APP (Serrano Carballal 2003) mostró que estas células sobreexpresan fuertemente los genes *GPNMB* (Glicoproteína (transmembrana) NMB), *COL6A3* (Colágeno del Tipo 6,  $\alpha 3$ ), *CRYAB* (Cristalina  $\alpha B$ ), *ZNF804A* (Proteína Con Dedos de Zinc 804A), *IGFBP7* (Proteína 7 de Unión al Factor de Crecimiento Tipo Insulina), *GNG12* (Proteína 12 de Unión a Guanina, (proteína G)). El gen *MMP2* (Metaloproteína de Matriz 2), sobreexpresado en el modelo celular a un nivel más moderado, nos pareció de interés por presentar actividad tipo  $\beta$ -secretasa (LePage y cols. 1995).

#### **• *GPNMB* (Glicoproteína (transmembrana) NMB)**

Se analizaron dos polimorfismos, uno en la posición -1 de la región promotora, con identificación [rs858239](#) y el otro situado en el intrón 2, con identificación [rs199348](#). Ambos SNPs se encuentran ligados prácticamente al 100%, con un desequilibrio de ligamiento con valor  $d=0.12$ , por lo que solamente detallaremos uno de ellos.

○ [rs199348](#).

*Muestra de España- Centro.* No se observó asociación en la muestra general, pero sí una tendencia a la asociación del alelo 1 (A) con la EA en los individuos no portadores de ApoE4 (OR=1.30 (0.97 – 1.74), p=0.08) y en los que presentan una edad temprana de aparición de los síntomas (OR=1.57 (1.00 – 2.47), p=0.05).

• **COL6A3 (Colágeno del Tipo 6,  $\alpha$ 3)**

Analizamos un polimorfismo en la región promotora, en la posición -65, con identificación [rs7599762](#), otro situado en el intrón 1, con identificación [rs2645779](#), y otro de una posible región reguladora, en 3'UTR, posición +606, con identificación [rs7436](#). Cada uno de estos polimorfismos pertenecía a un bloque haplotípico diferente, no observándose desequilibrio de ligamiento entre ellos.

○ [rs2645779](#).

*Muestra de España- Centro.* La distribución de alelos indicó una tendencia protectora frente a la EA del alelo 1 (A) (OR=0.78 (0.60 – 1.02), p=0.07), que en homocigosis (genotipo AA) confiere una protección significativa frente a la enfermedad (OR=0.44 (0.22 – 0.89), p=0.02).

La protección frente a la EA de los homocigotos AA estaba más acentuada en los individuos no portadores de ApoE4 (OR=0.39 (0.15 – 1.03), p=0.049), y en las mujeres (OR=0.31 (0.31 – 0.86), p=0.02).

○ [rs7436](#).

*Muestra de España- Centro.* Si bien en la muestra general no se observó ninguna asociación, al estratificar la población en función de ser o no portadores de ApoE4 se observan efectos opuestos: En los portadores la frecuencia del alelo 1 (A) estaba incrementada en los controles respecto a los casos, indicando una protección frente a la EA (OR=0.31, (0.12 – 0.82), p=0.01), mientras que en los no portadores la frecuencia del alelo 1 estaba incrementada en los casos, indicando una tendencia a su asociación con la EA (OR=1.68, (0.95 – 2.97), p=0.07).

- **CRYAB (Cristalina  $\alpha$ B)**

Analizamos tres polimorfismos de la región promotora, situados en las posiciones -626, -348 y -224, con identificaciones [rs762550](#), [rs4252583](#) y [rs14133](#), respectivamente, que no estaban ligados entre sí. Encontramos una tendencia a la asociación del SNP [rs14133](#) en no portadores de ApoE4, donde la frecuencia del alelo 1 (G) estaba ligeramente incrementada en los casos respecto a los controles (OR=1.29 (0.96 – 1.73, p=0.096).

- **IGFBP7 (Proteína 7 de Unión al Factor de Crecimiento Tipo Insulina)**

Analizamos dos polimorfismos, uno de la región promotora, en la posición -417, con identificación [rs4075349](#) y otro del intrón 2, con identificación [rs3755906](#) que no estaban ligados entre sí.

- [rs4075349](#).

*Muestra de España- Centro.* En la muestra general, la frecuencia del alelo 1 (A) estaba incrementada en los casos frente a los controles, indicando así un riesgo asociado a este alelo con la EA (OR=1.33, (1.06 – 1.67), p=0.014).

*Muestra de España - Cataluña.* Se observaba también una mayor frecuencia del alelo 1 (A) en los casos que en los controles (OR=1.15), aunque no se alcanzaba significatividad estadística.

Puesto que las distribuciones genotípicas eran similares, se combinaron las dos muestras, y se observó que el riesgo asociado al alelo 1 en la muestra combinada era significativo (OR=1.23 (1.04 – 1.45), p=0.011).

- [rs3755906](#).

*Muestra de España- Centro.* En el estrato poblacional de los individuos con edad tardía de aparición de los síntomas, la frecuencia del alelo1 (T) estaba disminuida en los casos frente a los controles, indicando una protección asociada a este alelo con la EA (OR=0.47, (0.23 – 0.98), p=0.04).

Así, entre los genes estudiados por su relación con la sobreexpresión de APP, los que codifican para *COL6A3* e *IGFBP7* eran los más consistentes en cuanto a su posible relación con riesgo de EA.



## OTROS GENES

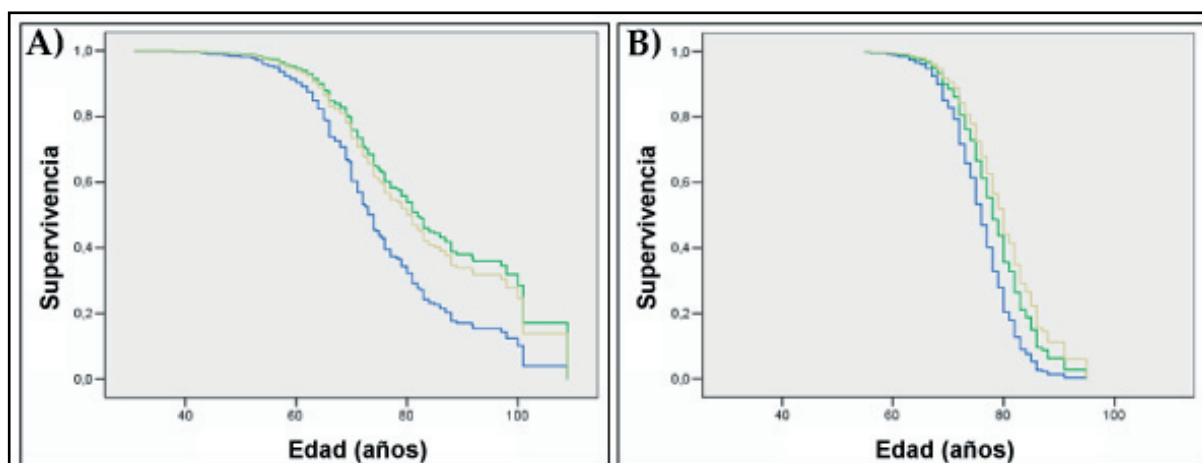
### • *PSEN1* (Presenilina 1)

Puesto que el gen de la Presenilina 1 (*PSEN1*) es portador de la mayor parte de las mutaciones causantes de la EA monogénica, consideramos de interés analizar su posible asociación con la EA esporádica. Analizamos 2 polimorfismos intrónicos: [rs3025786](#), del intrón 7, que detectamos mediante Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE) y que en el momento de secuenciarlo aparecía en la base de datos del NCBI como no validado y el [rs165932](#), del intrón 8, sobre el que nuestro laboratorio ya había descrito una asociación en una parte de la muestra de España- Centro (Aldudo y cols. 1997). Estos dos polimorfismos presentaban un pequeño desequilibrio de ligamiento ( $d=-0.012$ ) en la muestra de referencia.

#### ○ [rs3025786](#).

*Muestra de España - Centro.* Si bien en la muestra general no se observaba ningún riesgo ni tendencia, sí se observó una clara interacción con el genotipo ApoE: El alelo 1 (C) protegía frente a la EA en los portadores de ApoE4 ( $OR=0.47$  ( $0.22 - 1.00$ ),  $p=0.046$ ), mientras que en los no portadores se asociaba con riesgo ( $OR=1.78$  ( $1.09 - 2.92$ ),  $p=0.02$ ).

Además, en los individuos no portadores de ApoE4, observamos mediante estudios de supervivencia de Kaplan-Meier y de regresión de Cox que los homocigotos CC tenían claramente adelantada la edad de inicio de los síntomas respecto a los portadores del alelo 2 (T) (Figura 4, panel A).



**Figura R4.** Representación en curvas de Cox de la edad de aparición de los síntomas de EA en función del genotipo del SNP rs3025786 en los individuos no portadores de ApoE4 en las muestras de España - Centro (panel A) y de España - Cataluña (panel B).

Las curvas de supervivencia representan la frecuencia de individuos que se mantienen como controles en la edad indicada en función del modelo de Cox en individuos homocigotos para el alelo 2 (TT, en verde), en heterocigotos (CT, gris) y en homocigotos para el alelo 1 (CC, azul).



*Muestra de España - Cataluña.* Del mismo modo que ya indicamos en la muestra de referencia, se observaba una interacción con el genotipo ApoE: en los individuos portadores de ApoE4, el alelo 1 (C) mostraba una tendencia protectora frente a la EA (OR=0.51 (0.24 – 1.08),  $p=0.07$ ), mientras que en los no portadores no se observaba asociación significativa.

También se observó en los no portadores de ApoE4, igual que en la muestra de referencia, que los homocigotos para el alelo 1 (genotipo CC) tenían la edad de inicio adelantada respecto a los individuos con genotipo CT y TT (Figura R4, panel B), aunque en este caso la diferencia no alcanzaba la significatividad estadística.

*Muestra combinada.* En los portadores de ApoE4, el efecto protector del alelo C se hizo más significativo que en las muestras individuales (OR=0.51 (0.31 – 0.86),  $p=0.01$  para el alelo C y OR=0.45 (0.25 – 0.79),  $p=0.005$  para portadores de alelo C frente a homocigotos TT).

En los no portadores de ApoE4, los homocigotos CC presentan un adelanto en la edad de inicio de la EA, como ya se observaba en las muestras individuales.

En resumen, el polimorfismo [rs3025786](#) del intrón 7 de *PSEN1* estaba asociado con la EA esporádica, aparentemente como factor de riesgo en los portadores de ApoE4 y como modulador de la edad de inicio de la EA en los no portadores.

- [rs165932](#).

*Muestra de España - Centro.* El análisis de la muestra de referencia mostró que la frecuencia del alelo 1 (T) está incrementada en los controles respecto a los casos, indicando una protección de este alelo frente a la EA (OR=0.79 (0.63 – 1.00),  $p=0.046$ ), en línea con los resultados ya publicados por nuestro laboratorio en una parte de esta muestra (Aldudo y cols. 1997).

En resumen, el estudio de estos dos polimorfismos de *PSEN1* sugieren que este gen, además de portar mutaciones causantes de la EA monogénica, es un factor de riesgo para la esporádica.

• ***MTHFR* (Metilen-Tetra-Hidro-Folato Reductasa) y *MTRR* (5-Metiltetrahidrofolato-Homocisteína Metiltransferasa Reductasa)**

Se trata de dos genes clave en el metabolismo de la Hcy, que en concentraciones elevadas es neurotóxica.

En el gen *MTHFR* se estudiaron los polimorfismos [rs1801131](#), que genera un cambio de aminoácido Glu429Ala, y [rs1801133](#) que genera un cambio Ala222Val. Ambos SNPs están asociados con alteraciones en el correcto funcionamiento de la enzima, y se relacionan con niveles elevados de Hcy en sangre. El SNP [rs1801133](#) fue estudiado en colaboración con otro miembro de nuestro laboratorio, y los resultados se presentan en su tesis doctoral (Tenorio Vela 2007).

Estos dos polimorfismos están parcialmente ligados, con un desequilibrio de ligamiento de valor  $d=0.06$ .

○ [rs1801131](#).

*Muestra de España - Centro.* En el estrato poblacional de individuos con edad intermedia de inicio de los síntomas, el alelo 1 (C, Ala) estaba disminuido en los casos frente a los controles, indicando una protección por este alelo frente a la EA. En homocigotos CC, la protección frente a los portadores del alelo A alcanzaba la significatividad estadística (OR=0.40 (0.17 – 0.93),  $p=0.03$ ).

Además, se observó que el polimorfismo Ala222Val modulaba el riesgo asociado a éste: en los individuos portadores de Ala222, la protección asociada a la homocigosis CC del polimorfismo [rs1801131](#) se incrementaba y se hacía muy significativa (OR=0.28 (0.11 – 0.71),  $p=0.005$ ).

Esta protección del alelo [rs1801131](#) C frente a la EA coincide con los datos publicados en el meta-análisis de Bertram y colaboradores (Bertram y cols. 2007).

En el gen *MTRR* analizamos el polimorfismo con identificación [rs1801394](#), que genera un cambio de aminoácido Ile22Met, y que también está relacionado con alteraciones en los niveles de homocisteinemia.

○ [rs1801394](#).

*Muestra de España - Centro.* La distribución de alelos indicaba una pequeña tendencia a la asociación del alelo 1 (G) con la enfermedad (OR=1.28 (0.97 – 1.67),  $p=0.08$ ), que se hacía más significativa en no portadores de ApoE4 (OR=1.42 (1.00 – 2.01),  $p=0.05$ ) y en mujeres (OR=1.46 (1.04 – 2.06),  $p=0.03$ ).

• **YWHAB (Proteína 14-3-3  $\beta$  o Proteína de Activación Tirosina 3-monooxigenasa / Triptófano 5- Monooxigenasa)**

Las proteínas 14-3-3 han sido relacionadas con la EA, principalmente por su papel en relación con la proteína asociada a microtúbulos Tau. En el gen que codifica para la isoforma  $\beta$  de esta familia de proteínas (YWHAB), analizamos el polimorfismo con identificación [rs3208334](#), de la región 3'UTR, a 93 bases de la parada de la traducción, y que podría modificar en función del genotipo la estabilidad o el procesamiento del ARN mensajero.

○ [rs3208334](#).

*Muestra de España - Centro.* Si bien en la muestra general la distribución de alelos y genotipos no indicaba asociación, al estratificar la población en función del hecho de ser o no portador de ApoE4, pudimos observar un riesgo asociado al alelo 1 (A) en los individuos portadores (OR=1.90 (1.11 – 3.26),  $p=0.02$ ).

Además, también se observó riesgo en los individuos más jóvenes (OR=1.58 (1.09 – 3.12),  $p=0.02$ ).

Así, el gen YWHAB parece estar asociado a la EA en función del genotipo APOE y de la edad de inicio.

- o O o -

Tras un análisis global de los estudios de asociación, nuestros datos mostraron que en todos los bloques había algún gen que se asociaba de forma significativa o como tendencia con la EA, sugiriendo que todas las funciones estudiadas pueden participar en cierta medida en la patogénesis o en el desarrollo de la EA. Por otra parte, no en todos los grupos funcionales el porcentaje de positivos entre los genes analizados era el mismo. Así, mientras que todos los genes estudiados por su relación con la infección por HSV-1 (3 de 3) y con el estrés oxidativo (2 de 2) mostraron asociación, se encontraron tanto genes positivos como negativos entre los procedentes de los modelos de respuesta integrada a estrés (incluyendo los genes del modelo de ERE, 4 positivos de 7), de estrés adrenérgico (3 de 5) y por su respuesta a la sobreexpresión de APP (4 de 7). En cuanto a los genes analizados que surgen a partir de datos bibliográficos, encontramos asociación en 4 de los 6 genes analizados.

TABLA R1

Lista de SNPs analizados y asociación observada

Gen	dbSNP	ASOCIACIÓN	
		Muestra de Referencia <sup>1</sup>	Muestras de Réplica <sup>2</sup>
RELACIONADOS CON LA INFECCIÓN POR HERPES SIMPLEX VIRUS TIPO I			
EIF2AK2	rs2254958	Muestra General	Positiva
	rs4648174	Modulación Inicio	
	rs3770768	Ligado al anterior	Ligado al anterior
PVRL2	rs3770768	ApoE4- (Tendencia)	Negativa
	hCV11711387	Muestra General	Negativa
	rs3745150	Varones ApoE4-	Positiva
TAP2	Haplotipo TAP2 A/B	Muestra General	Positiva
INDUCIDOS POR ESTRÉS OXIDATIVO			
PLA2G3	rs3788428	ApoE4+ (Tendencia)	ND
	rs9619169	Muestra General, más en Precoces	Positiva
	rs2232170	Ligado al anterior	Negativa (No ligado)
	rs2074734	Negativa	ND
	rs2074735	Negativa	ND
	rs2072193	Negativa	ND
	rs740231*	ApoE4-	ND
HMGCR	rs3761740	Muestra General	Positiva
	rs5909	Ligado al anterior	Ligado al anterior
INDUCIDOS POR ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO			
DDIT3	rs3847699	Tardíos.	Negativa
		Modulación Inicio	Positiva
DNAJB9	rs2227272	Precoces	ND
EIF2AK3	rs1805164	Negativa	ND
	rs1805165	Negativa	ND
HSPA5	rs17840761	Negativa	ND
	rs391957	Negativa	ND
HYOU1	rs13929	Muestra General (Tendencia), significativa en Mujeres	ND
	rs1003081	Ligado al anterior	ND
RELACIONADOS CON LA RESPUESTA INTEGRADA A ESTRÉS			
MAP1LC3B	rs11117269	Asociación en Muestra General.	Positiva
	rs9903	Modulación Inicio	
PPP1CA	rs9903	No asociación	ND
	rs7480390	Negativa	ND
INDUCIDOS OPR ESTRÉS ADRENÉRGICO			
ARID4A	rs1051858	Tardíos (Tendencia)	ND
CAPN9	rs3895368	Negativa	ND
	rs1933631	Negativa	ND
DSC1	rs1789072	Varones	Positiva
IFT74	rs3429	Negativa	ND
TMC5	rs2245086	Muestra General (Tendencia)	Negativa

**INDUCIDOS POR SOBREENPRESIÓN DE APP**

GPNMB	rs199348	ApoE4- (Tendencia)	ND
	rs858239	Ligado al anterior	ND
COL6A3	rs7599762	Negativa	ND
	rs2645779	Muestra General, más en ApoE- y en Mujeres	ND
	rs7436	Interacción con Genotipo ApoE	ND
CRYAB	rs762550	Negativa	ND
	rs4252583	Negativa	ND
	rs14133	ApoE4- (Tendencia)	ND
ZNF804A	rs10497655	Negativa	ND
IGFBP7	rs4075349	Muestra General	Positiva
	rs3755906	Tardíos	ND
GNG12	rs2295942	Negativa	ND
MMP2	rs2287073	Negativa	ND
	rs2287074	Varones (Tendencia)	ND
	rs7201	Negativa	ND

**CAUSANTES DE EA MONOGENICA**

PSEN1	rs3025786	Interacción con Genotipo ApoE. Modulación Inicio	Positiva
	rs165932	Muestra General	ND

**Genes relacionados con el metabolismo del Colesterol**

ABCA2	rs908832	Negativa	ND
-------	----------	----------	----

**RELACIONADOS CON EL METABOLISMOS DE LA HOMOCISTEÍNA**

MTHFR	rs1801133	Muestra General	ND
	rs1801131	Interacción SNP anterior	ND
MTRR	rs1801394	Muestra General (Tendencia)	ND

**REPARACIÓN DE DAÑOS EN EL ADN**

POLL	rs3730477	Negativa	ND
------	-----------	----------	----

**FAMILIA MULTIGENICA DE LAS PROTEÍNAS 14-3-3**

YWHAB	rs3208334	ApoE4+ y Precoces	ND
-------	-----------	-------------------	----

**Tabla R1.** Lista de SNPs estudiados y asociación observada.

Se agrupan los genes en función de la aproximación de la que surge como gen candidato. Para cada uno se indican los SNPs analizados (dbSNP), <sup>1</sup> la asociación de éstos con la Enfermedad de Alzheimer en la muestra de referencia y/o si modula la edad de aparición de los síntomas y <sup>2</sup> si la asociación observada se mantiene en las muestras de réplica (Positiva, sí; Negativa, no; ND, no determinado).

## 5.2. Funcionalidad de las variantes alélicas

Debido a que el polimorfismo estudiado del gen de *DDIT3* ([rs3847699](#)), que se asociaba con cambios en la edad de aparición de los síntomas de la EA, se encuentra en la región promotora del mismo, esto es, en una zona posiblemente implicada en la regulación de la expresión génica, nos propusimos investigar si la asociación de estas variantes con la EA era debida a diferencias funcionales de las mismas que pudieran implicar una variación en los niveles de proteína, ya fuera en condiciones normales o en células sometidas a estrés (oxidativo y/o de retículo). Para ello, diseñamos una estrategia experimental basada en ensayos con células SK-N-MC transfectadas con las construcciones generadas con ambas variantes alélicas de este polimorfismo.

### 5.2.1. Obtención de las construcciones plasmídicas empleadas

Clonamos en el vector de expresión pcDNA3 un producto amplificado que abarca la región entre las posiciones -1626 a +60 (forma alélica -1507C), tomando la posición +1 en el inicio de la transcripción. Posteriormente se extrajeron por enzimas de restricción las regiones promotoras desde pcDNA3 para subclonarlas en el vector pXP2. Para facilitar el clonaje, los oligonucleótidos empleados en la PCR incluyen dianas de restricción adecuadas.

De esta manera, obtuvimos un plásmido que contenía el promotor del gen de interés unido en 5' a la secuencia codificante de la luciferasa. Estas construcciones fueron empleadas para realizar sobre ellas la mutagénesis dirigida y obtener la otra variante alélica: -1507G (promotor de *DDIT3*).

Los plásmidos fueron secuenciados en el PCM, determinando que la secuencia promotora del gen *DDIT3* coincidía con la publicada en la base de datos del NCBI con número de acceso NT\_029419, más concretamente, con las bases comprendidas entre la posición 20059232 y la 20057547, excepto en la posición 20058998 (posición respecto al inicio de la transcripción -1380), donde se encontraba la variante C del polimorfismo dbSNP rs1148550.

### 5.2.2. Obtención de dos líneas celulares que expresan de forma estable la proteína luciferasa bajo el control del promotor de *DDIT3*

Cotransfectamos de forma estable la línea celular de neuroblastoma humano SK-N-MC con la construcción plasmídica pXP2-*DDIT3* (una construcción para cada alelo del SNP en la posición -1507, C y G) ya descrita, y pcDNA3, que confiere resistencia al antibiótico Geneticina, para seleccionar los clones que han adquirido los plásmidos.

Se aislaron y amplificaron 16 colonias resistentes a Geneticina y se analizó su expresión

basal de luciferasa. Se seleccionaron los clones que en condiciones basales tenían una actividad luciferasa de 10000 o más cuentas por volumen de ensayo, y se determinó su carga plasmídica como se describe en el apartado 4.7.2 de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos para cada clon celular se detallan en la Tabla R2.

**Tabla R2.** Análisis de los clones transfectados establemente con las construcciones en pXP2- *DDIT3*- Luciferasa, variantes -1507 C y G

-1507C			-1507G		
CLON	Luciferasa (cuentas) <sup>1</sup>	% copias pXP2 / 18S <sup>2</sup>	CLON	Luciferasa (cuentas) <sup>1</sup>	% copias pXP2 / 18S <sup>2</sup>
C1	69.198	6,05	G1	1.841	nd
C2	69.198	4,66	G2	25.168	82,73
C3	70.883	3,31	G3	64.915	8,36
C4	147.104	3,46	G4	318.561	24,90
C5	145	nd	G5	112.015	34,74
C6	145.213	3,77	G6	218	nd
C7	222.361	17,25	G7	62.890	6,97
C8	4.778	nd	G8	3.240	nd

**Tabla R2.** Análisis de los clones transfectados.

Para cada clon analizado se muestran <sup>1</sup> las cuentas de luciferasa obtenidas en un 10% de extracto celular proveniente de un pocillo de M24 al 80% de confluencia y, <sup>2</sup> en el caso de determinarse, la cantidad de copias relativas a la cantidad de 18S del extracto como indicador de la carga plasmídica por célula (nd, no determinado).

Decidimos continuar adelante con las colonias C1 (alelo -1507C) y G7 (alelo -1507G) por tener tanto un crecimiento celular como una carga plasmídica similares.

### 5.2.3. Estudio de la actividad transcripcional del promotor de *DDIT3*

Los plásmidos con la región promotora de *DDIT3* fueron empleados en experimentos de transfección transitoria y estable en células SK-N-MC.

Las células fueron transfectadas empleando lipofectamina, que forma complejos con los plásmidos, y que son los que las células captan. Posteriormente fueron tratadas según modelos puestos a punto en el laboratorio para simular situaciones de estrés (oxidativo y/o de retículo) durante suficiente tiempo como para permitir a las células expresar luciferasa, que es la actividad que se ensaya para determinar la actividad transcripcional de los promotores clonados en respuesta a estos estímulos.

#### 5.2.3.1. En células transfectadas transitoriamente

Se realizaron experimentos puntuales y de cinética de diferentes condiciones de cultivo en células SK-N-MC que expresan transitoriamente la enzima luciferasa bajo la regulación del promotor de *DDIT3* con las variantes alélicas C y G en la posición -1507.



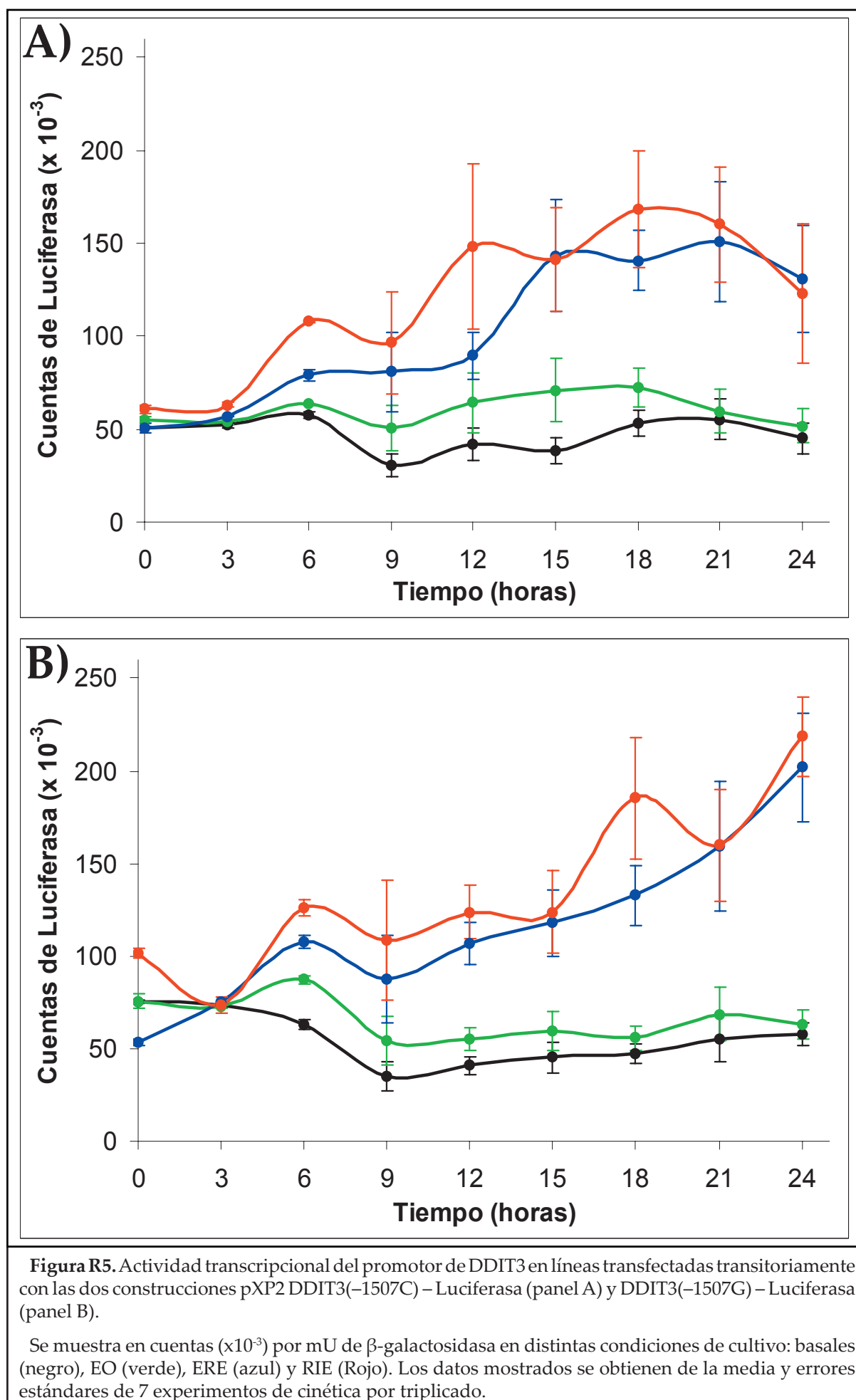
En la Figura R5 se muestra la actividad transcripcional de las dos construcciones en las diferentes condiciones de cultivo a lo largo del tiempo.

En respuesta a las diferentes condiciones podemos observar que, para ambas variantes alélicas, hay una ligera estimulación de la actividad transcripcional en respuesta a las condiciones de cultivo de EO y una activación más acusada en respuesta a las condiciones de ERE y de RIE. Estos resultados están en consonancia con datos previos del laboratorio que mostraban que los niveles de ARN mensajero del gen *DDIT3* endógeno aumentaban ligeramente en respuesta a EO y de forma muy acusada a ERE y a RIE (Vicente Cenzano 2007). A la luz de estos datos, podríamos afirmar que la región promotora clonada contiene los elementos mínimos necesarios para mantener la capacidad de respuesta del gen a estos estímulos.

El análisis detallado del comportamiento de ambas variantes alélicas mostró que:

- En el caso de la variante alélica -1507C (Fig. R5, panel A), en todas las condiciones de cultivo, podemos observar un primer pico de actividad a las 6 horas de tratamiento, y a partir de ese punto la actividad transcripcional siguió un patrón diferente para cada condición de cultivo. En concreto:
  - En condiciones basales observamos a las 9 horas una disminución de la actividad significativa respecto a los valores obtenidos en los tiempos iniciales, que se recuperan a partir de las 18 horas.
  - En condiciones de EO la disminución de la actividad transcripcional a las 9 horas es menor que en condiciones basales, de manera que la actividad parece ser ligeramente superior a la observada en el cultivo no estimulado. Esta mayor actividad transcripcional se observaba en todos los tiempos analizados, si bien no alcanzaba en todos ellos la significatividad estadística.
  - En condiciones de ERE, después del pico de actividad transcripcional de las 6 horas, que ya es estadísticamente significativo respecto a las condiciones basales, podemos observar un aumento mayor de la actividad transcripcional a partir de las 12 horas de tratamiento, llegando a un máximo entre las 15 y las 21 horas de tratamiento.
  - En condiciones de RIE, la actividad transcripcional presenta un perfil temporal similar al descrito en condiciones de ERE, aunque se observaba claramente una tendencia a que la actividad transcripcional fuera mayor en estas condiciones que en las de ERE.
- En la variante alélica -1507G (Fig. R5, panel B) podemos observar en todas las condiciones de cultivo a las 6 horas de tratamiento el mismo pico de actividad transcripcional ya descrito para el alelo -1507C. Sin embargo, a partir de este punto la actividad transcripcional varía ligeramente respecto a lo descrito para otra variante. En





concreto:

- En condiciones basales la actividad transcripcional no llega a recuperar el nivel inicial. Podemos observar el mismo mínimo de actividad a las 9 horas, y a partir de ese punto el aumento de la actividad es más moderado.
- En condiciones de EO, la disminución a las 9 horas de tratamiento es más acusada que en el caso de la variante -1507C, manteniéndose el perfil de actividad paralelo al perfil de las condiciones basales, ligeramente por encima de éste, pero aunque la diferencia no era significativa.
- En condiciones de ERE se observa un aumento estadísticamente significativo y progresivo en la actividad transcripcional a partir de las 9 horas, con un valor máximo a 24 horas.
- En condiciones de RIE se observa un perfil de expresión a lo largo del tiempo similar al de las condiciones anteriores, pero con una actividad transcripcional ligeramente superior. Sin embargo, la diferencia es estadísticamente significativa únicamente a las 18 horas de tratamiento.

Para comparar la actividad transcripcional de ambas variantes alélicas en las diferentes condiciones de cultivo, extraemos de la cinética los valores obtenidos a las 18 horas de tratamiento, donde se observan las mayores actividades transcripcionales en respuesta a los estímulos, y normalizamos la actividad luciferasa en función de la correspondiente al alelo de menor riesgo para la EA (variante -1507C) en condiciones basales.

Los resultados mostraron que ambas variantes alélicas respondían de forma similar a todas las condiciones de cultivo. Así, el índice de estimulación (actividad normalizada respecto al alelo C en condiciones basales) era de 2.6 y 2.8 veces en respuesta a ERE y de 3.2 y 3.9 en respuesta a RIE (alelo C y alelo G, respectivamente), no observando estimulación en respuesta a EO.

### 5.2.3.2. En células transfectadas establemente

Se estudió la regulación de la actividad luciferasa en respuesta al estrés (EO, ERE y RIE) de células SK-N-MC que expresan esta enzima de forma estable, bajo la regulación del promotor de *DDIT3* con las variantes alélicas C y G en la posición -1507 (clones C1 y G7, respectivamente).

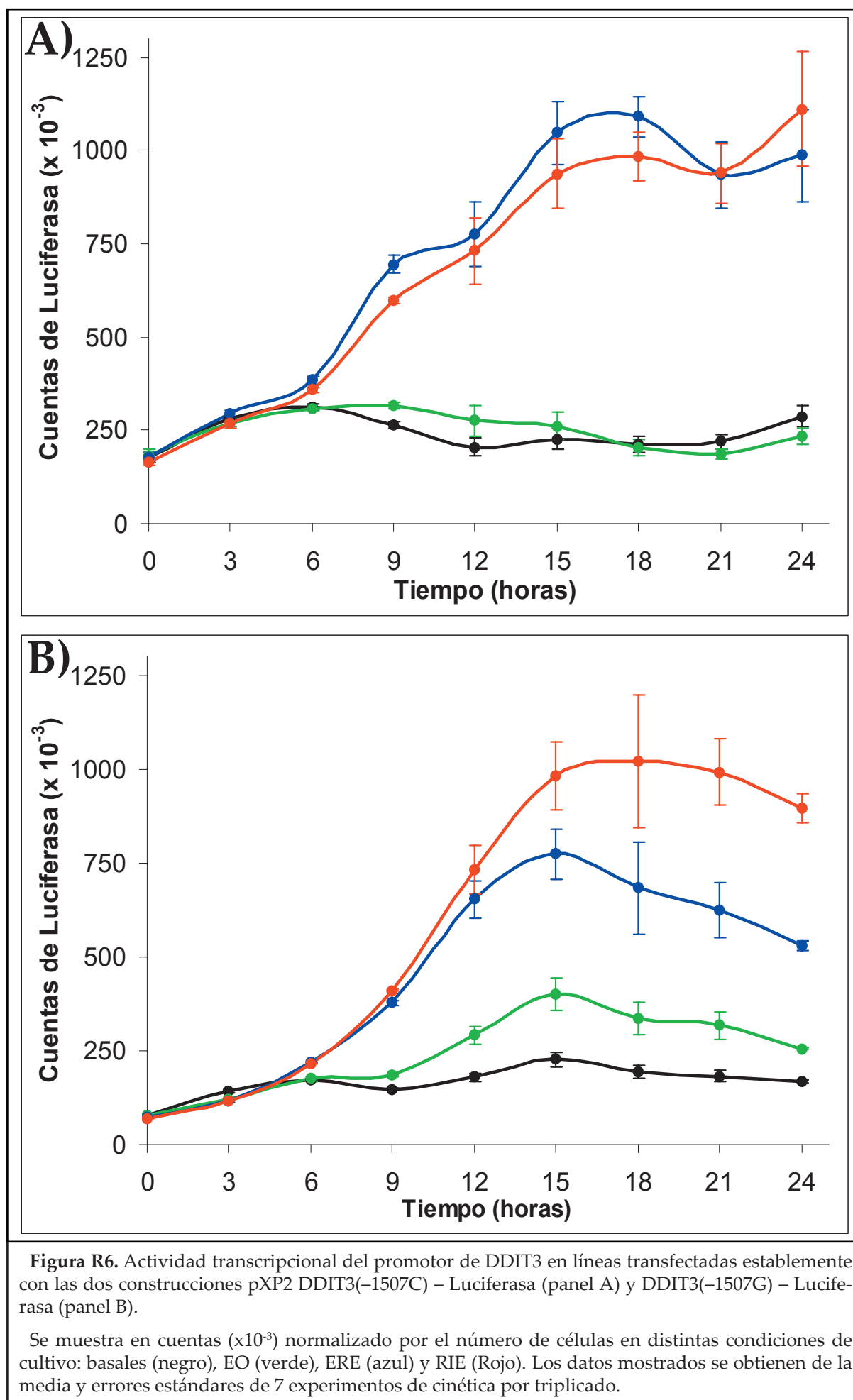
La Actividad luciferasa se normalizó respecto a la carga plasmídica por célula y respecto al número de células (según métodos descritos en el apartado 4.7.2). Se comprobó que la carga plasmídica era la misma para ambas líneas celulares y que no se alteraba por los tratamientos utilizados (datos no mostrados).

En la Figura R6 se muestra la actividad luciferasa durante un tratamiento de 24 horas recogiendo puntos cada 3 horas, y que corresponde a la cuantificación de actividad transcripcional del promotor *DDIT3*, para ambas variantes alélicas, a lo largo del tratamiento.

En condiciones basales se observa que la actividad transcripcional se mantiene prácticamente constante a lo largo de todo el estudio, sin apreciar diferencias significativas entre ambas variantes. Además, se observa para ambas variantes alélicas una estimulación muy acusada en respuesta a las condiciones de cultivo de ERE y de RIE.

El análisis detallado del comportamiento de ambas variantes alélicas en respuesta a los diferentes estímulos mostró que:

- Línea celular DDIT3(-1507C) (Fig. R6, panel A).
  - En condiciones de EO, se observa que la actividad transcripcional del promotor se mantiene prácticamente constante a lo largo del tiempo, sin apreciar diferencias estadísticamente significativas respecto a la actividad en condiciones basales, sugiriendo que esta construcción no se estimula por estrés oxidativo.
  - En condiciones de ERE, se empieza a observar a partir de las 6 horas de tratamiento un aumento progresivo de la actividad transcripcional estadísticamente significativa hasta llegar a valores máximos de actividad en torno a las 15-18 horas de tratamiento.
  - En condiciones de RIE, la actividad transcripcional es similar a la ya descrita en condiciones de ERE, pero con unos niveles de actividad transcripcional ligeramente por debajo de los observados en estas condiciones, si bien esta diferencia no es estadísticamente significativa.
- Línea celular DDIT3(-1507G) (Fig. R6, panel B).
  - En condiciones de EO se puede observar a partir de las 9 horas de tratamiento una actividad transcripcional en respuesta al estímulo ligeramente mayor que la actividad observada en condiciones basales, con un máximo de actividad a las 15 horas.
  - En condiciones de ERE, también se observa un aumento progresivo de la actividad transcripcional, estadísticamente significativo a partir de las 6 horas de tratamiento que es muy pronunciado a partir de las 9 horas y alcanza un máximo en torno a las 15 horas.
  - En condiciones de RIE, el perfil de actividad transcripcional es similar al descrito en condiciones de ERE pero la actividad es mayor, de manera que a partir de las 15 horas de tratamiento la diferencia entre estas dos respuestas es estadísticamente significativa.



En resumen, este estudio mostraba una diferencia de comportamiento de los alelos C y G en respuesta a EO, así como a las condiciones de RIE respecto a los de ERE. Para cuantificar esta diferencia, utilizamos los datos correspondientes a 15 horas de cultivo, tiempo en que la actividad transcripcional alcanzaba el máximo en todos los cultivos, aunque este comportamiento diferente se mantiene para todos los tiempos superiores a este tiempo (ver la figura R6). Los resultados de la comparación, expresando la actividad transcripcional en veces respecto a las condiciones basales de cultivo, se muestran en la tabla R3.

**Tabla R3.** Activación del promotor *DDIT3* por Estrés Oxidativo (EO), del Retículo Endoplásmico (ERE) y su combinación (RIE)

	-1507C	-1507G
EO	1.1 ± 0.2	1.8 ± 0.2 *
ERE	4.6 ± 0.4	3.4 ± 0.3 *
RIE	4.1 ± 0.4	4.3 ± 0.4

**Tabla R3.** Activación del promotor *DDIT3*.

Se muestra la actividad luciferasa de las células transfectadas establemente con las construcciones pXP2 - *DDIT3* - Luciferasa (-1507C o -1507G) a las 15 horas de tratamiento, respecto a las células no tratadas, en veces ± el error estándar de la media.

\* Significativo respecto al alelo C (t de Student  $p < 0.05$ ).

Se observa que la variante -1507G se estimula casi dos veces (1.8) por Estrés Oxidativo, mientras que la variante C no responde a este estímulo.

El Estrés de Retículo Endoplásmico aumenta la actividad transcripcional de ambas variantes, aunque la C muestra una estimulación superior a la G (4.6 y 3.4 veces, respectivamente).

Las dos variantes del promotor de *DDIT3* muestran la misma estimulación (alrededor de 4 veces) por la combinación de Estrés Oxidativo y de Retículo Endoplásmico (condiciones de RIE). Para la variante C, esta estimulación es la misma a la debida al ERE solo, lo que está en línea con la ausencia de respuesta de esta variante al EO. En contraste, la variante G responde más a la combinación de estímulos (4.3 veces) que a ambos estímulos por separado (3.4 y 1.8 veces, para ERE y EO, respectivamente).

Por tanto, este estudio de la actividad transcripcional en función del alelo -1507 de *DDIT3* sugiere que en condiciones de EO solamente responde el alelo G, en la de ERE responden ambos, aunque más el alelo C y en condiciones de RIE, así como en las basales, no se encuentran diferencia apreciables entre ambos alelos.



---

## DISCUSIÓN

---





## 6. DISCUSIÓN

A pesar de que los dos tipos de la EA - familiar y esporádica - comparten unas características clínicas semejantes, su etiología es completamente diferente. Así, si la EA familiar es fundamentalmente genética, con origen en mutaciones en uno de los tres genes identificados hasta la fecha (*APP*, *PSEN1* y *PSEN2*), la EA esporádica es mucho más compleja y en ella convergen factores tanto genéticos como ambientales.

Hay multitud de factores genéticos descritos como de susceptibilidad para la EA esporádica, que actúan en distintas vías de señalización o en distintos módulos funcionales (Bertram y cols. 2007).

En nuestro grupo de investigación, nos planteamos el estudio de SNPs como posibles indicadores de la implicación de funciones candidatas en la patogénesis de la EA esporádica, seleccionando dichos SNPs en genes que surgen como candidatos a partir de datos bibliográficos y, mayoritariamente, de modelos celulares y animales de neurodegeneración puestos a punto previamente en nuestro laboratorio. Prácticamente ninguno de estos genes había sido estudiado previamente por su relación con la EA.

### 6.1. Asociación genética

A continuación, procedemos a discutir las asociaciones genéticas encontradas, agrupando los genes en los distintos módulos funcionales por los que hemos estudiado cada uno de ellos:

#### GENES RELACIONADOS CON LA INFECCIÓN POR *HERPES SIMPLEX VIRUS* TIPO I

Cada vez hay más evidencias que sugieren la posible implicación de agentes infecciosos en la patogénesis de la EA, y un buen candidato es el HSV-1, entre otras razones, porque es el más prevalente en cerebros humanos, donde se encuentra de forma latente.

Desde la primera evidencia de su implicación en la EA (Itzhaki y cols. 1997), nuestro laboratorio ha seguido diferentes aproximaciones para confirmar esta hipótesis, obteniendo numerosos datos consistentes con ella. Por una parte, en modelos murinos: hemos visto que la llegada del virus al cerebro vía hematógena es más eficiente mediante ApoE4 que mediante ApoE3 (Burgos y cols. 2003), y además que esta llegada también es dependiente de la dosis génica del gen *ApoE* (Burgos y cols. 2002; Burgos y cols. 2006). Por otra parte, se ha asociado con la EA genes humanos relacionados con la infección por HSV-1 mediante estudios caso - control, como veremos a continuación.

Se analizaron genes representativos de distintas etapas de la infección por este

virus: *EIF2AK2* en respuesta celular, *PVRL2* en entrada del virus a las células y *TAP2* en inmunoevasión. En primer lugar, es destacable el hecho que todos los genes analizados por su relación con el HSV-1 estaban asociados con la EA en la muestra de referencia, y que este resultado se replicó en al menos una de las muestras de réplica.

EL gen *EIF2AK2* codifica para la proteína PKR (Proteína Kinasa activada por ARN de doble hebra), que media la fosforilación del factor *EIF2α* en respuesta a infecciones por virus cuyo material genético sea ARN de doble hebra, mediando así la respuesta celular a la infección y constituyendo un importante nexo virus-huésped en relación con la neurodegeneración. Fosforilando a este factor, se activa la Respuesta Integrada a Estrés para abocar a las células infectadas a apoptosis y tratar de eliminarlas, representando un mecanismo crucial de defensa por parte de las células huésped contra la infección viral (McKenna y cols. 2006).

La asociación de *EIF2AK2* con la EA podría sugerir una interacción de este gen con el virus que regulase la apoptosis o la supervivencia celular frente a una infección del mismo. De hecho, la PKR ya ha sido relacionada con la EA en estudios histopatológicos previos que indican que la forma activa de la PKR se encuentra sobreexpresada en cerebros de pacientes de EA (Onuki y cols. 2004).

Los tres SNPs analizados de este gen mostraron asociación con la EA en la muestra de referencia. En concreto, el [rs2254958](#), que mostró asociación en las tres muestras analizadas y afectaba a la edad de aparición de los síntomas, se encuentra en 5' UTR, y, según el programa PupasSuite para predecir la posible funcionalidad de las variantes genéticas, podría modificar el *splicing* del ARN mensajero: el alelo C forma parte de un elemento potenciador de la unión de SRp55, mientras que el otro alelo (T) previene de esta unión (<http://pupasuite.bioinfo.cipf.es>). Mediante su efecto sobre el procesamiento o a la estabilidad del ARN mensajero, esta variante genética podría modificar los niveles de proteína PKR en la célula.

Los resultados están en línea con la idea de que PKR podría participar en el proceso neurodegenerativo inducido por la infección, mediando la fosforilación del factor de la traducción *EIF2α* para bloquear la traducción de proteínas virales. La magnitud de la respuesta RIE a la infección dependería del genotipo del huésped, y por tanto frente a una misma carga viral el proceso neurodegenerativo asociado sería diferente en individuos con diferente genotipo *EIF2AK2*.

En cuanto a la asociación encontrada entre la EA y *PVRL2*, puesto que se trata de un gen que codifica para un receptor que media la entrada de ciertos herpesvirus (Schmidt y cols. 2006), podría sugerir una diferente permisividad a la entrada del HSV-1 en las neuronas, lo que podría así modificar la carga vírica en función del genotipo *PVRL2*, y por tanto el grado de neurodegeneración asociado a la infección.

Además, la asociación diferencial en función del género resulta interesante, ya que está descrito que la infección por HSV-1 difiere según el género: en modelos murinos, las

hembras son más susceptibles a la infección del cerebro que los machos (Burgos y cols. 2005), y, generalmente, está aceptado que las mujeres tienen mayor susceptibilidad para la EA que los varones. Aunque es especulativo, se podría considerar que el polimorfismo en *PVRL2*, cuyo alelo mayoritario protege a los varones, fuera en parte responsable de una menor permisividad de entrada del virus a las células, y por tanto de una menor neurodegeneración asociada a la infección, en los varones.

El gen *TAP2* codifica para la Proteína Transportadora de Antígenos 2, cuyo bloqueo es la vía empleada por HSV-1 para evadir el sistema inmune (Bauer y cols. 2002). La asociación de polimorfismos en *TAP2*, y de su combinación con *APOE*, con la EA podría indicar algún tipo de interacción biológica de estos dos genes en relación con la enfermedad. Puesto que ambos juegan un papel relevante en la llegada del virus al cerebro (*APOE* está implicado en neuroinvasión (Burgos y cols. 2002; 2003) y *TAP2* en inmunoevasión (Bauer y cols. 2002)), estos datos sugieren que las variantes genéticas del huésped que facilitan la llegada de HSV-1 al cerebro se asocian con mayor susceptibilidad para la EA.

No hay datos publicados sobre el efecto funcional del haplotipo *TAP2* potencialmente causante de su asociación con la EA. Para estudiarlo, recientemente se han generado en nuestro laboratorio tres líneas de ratones transgénicos que expresan correctamente los genes *TAP1A*, *TAP2A* y *TAP2B* humanos, y que permitirán el estudio de procesos patológicos a los que se ha asociado el complejo TAP (Serrano Sáiz 2007).

En resumen, tres genes representativos de tres etapas diferentes de la infección por HSV-1 están asociados con la EA, sugiriendo un nexo entre la susceptibilidad genética a infecciones del sistema nervioso central, en concreto por el virus HSV-1, y la posterior aparición de la enfermedad neurodegenerativa de Alzheimer. Este nexo podría dirigir la prevención de esta enfermedad hacia una posible terapia futura antiviral y a una inmunización frente a este virus en la infancia (Itzhaki y cols. 2004b).

Tanto en el caso de *EIF2AK2* como *TAP2*, los únicos datos referentes a su asociación con la EA que aparecen en la página Web <http://www.alzgene.org> son los publicados recientemente por nuestro grupo de trabajo (Bullido y cols. 2007a; Bullido y cols. 2007b). Para el gen *PVRL2* no encontramos publicado ningún dato de asociación con la EA.

### **GENES INDUCIDOS POR ESTRÉS OXIDATIVO**

En un *microarray* de expresión realizado sobre un modelo celular sometido a estrés oxidativo, se observó que los genes *PLA2G3* y *HMGCR* estaban entre los que más se estimulaban en respuesta a este estrés.

En el gen *PLA2G3* solamente pudimos observar asociación en los SNPs de las regiones reguladoras del gen, y no en los SNPs de la región codificante. Este hecho podría sugerir que la susceptibilidad para la EA está más influida por los niveles de proteína que por la estructura de la misma, en consonancia con el hecho de que trate de un gen cuya expresión se ve alterada en un modelo en el que se simula un posible mecanismo patogénico de la enfermedad.

Un SNP del promotor de *PLA2G3* ([rs9619169](#)) mostró asociación con la EA en la muestra de referencia, y esta asociación se replicó en la muestra de Canadá y en la de España - Cataluña, aunque no era significativa en las muestras individuales, posiblemente porque el riesgo asociado es bajo y se necesita un elevado tamaño muestral para conseguir un poder estadístico suficiente.

Podría ocurrir que polimorfismos que afectasen a los niveles de *PLA2G3* alterasen la capacidad de respuesta celular al daño oxidativo generado por el propio envejecimiento del organismo o por otros factores. De hecho, el alelo asociado con riesgo para padecer la EA (C) forma parte de un sitio putativo de unión para el factor de transcripción Spi-B, sitio que desaparece con el alelo protector (A) (<http://bio.chip.org/mapper>).

De este factor de transcripción, con identificación en el NCBI Q01892, se sabe que se expresa en células B y en células dendríticas plasmacitoides (*plasmacytoid dendritic cells*, pDCs), y que promueve el desarrollo de estas últimas, que así pueden producir grandes cantidades de interferón y bloquean infecciones virales (<http://www.expasy.org/>).

Respecto a asociaciones con la EA publicadas para el gen *PLA2G3*, en <http://www.alzgene.org> no hay información, aunque sí aparece una asociación de otra fosfolipasa A<sub>2</sub>, del grupo IB (*PLA2G1B*).

El segundo gen de este módulo, *HMGCR*, codifica para una enzima clave en el metabolismo del colesterol y en la regulación de sus niveles en el organismo (Kajinami y cols. 2004). Se han relacionado niveles elevados de colesterol en sangre con riesgo de desarrollar EA. Entre las evidencias que refuerzan esta hipótesis se encuentra el hecho de que el mayor factor de riesgo genético de la EA esporádica es ApoE, que es el transportador de colesterol en el Sistema Nervioso Central (Canevari y cols. 2007).

Además, se ha observado que pacientes de enfermedades cardiovasculares tratados con estatinas para reducir los niveles de colesterol tienen menos riesgo de desarrollar EA (Wolozin y cols. 2000), y es esta enzima la que juega un papel clave en la respuesta al tratamiento con estatinas (Kajinami y cols. 2004).

Nuestros resultados muestran una asociación con la EA de un SNP del promotor ([rs3761740](#)), en línea con un trabajo publicado muy recientemente sobre este mismo SNP

(Porcellini y cols. 2007). Más concretamente, el alelo C en homocigosis confiere protección frente a la EA y el alelo A del mismo SNP parece adelantar la edad de aparición de los síntomas.

El programa ChipMapper predice que el alelo C forma parte de sitios de unión de los factores de transcripción SRF (*Serum Response Factor*) y SMAD4 (*Mothers against decapentaplegic homolog 4*); mientras que el alelo A no. De esta manera, este SNP podría alterar el funcionamiento de una región reguladora de la expresión de este gen, afectando a los niveles de proteína HMGCR, y así a los niveles de colesterol en el organismo. En concreto, se ha observado una relación entre el SRF y el fenotipo EA en cuanto a que está sobreexpresado en cerebros de individuos con la enfermedad (Chow y cols. 2007).

### **GENES INDUCIDOS POR ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO**

El gen *DDIT3* es un punto crítico en la inducción de apoptosis por vía mitocondrial. El resultado más relevante del estudio de asociación, que se replicó en dos muestras independientes, era un aparente efecto de un polimorfismo del promotor ([rs3847699](#), en -1507) sobre la edad de aparición de los síntomas de la EA, que parecía retrasarse en los individuos portadores del alelo G. Este polimorfismo se ha sometido a un estudio funcional, por lo que la posible alteración funcional producida por él en relación con la EA y la neurodegeneración se discute en el apartado 6.2 (“Consecuencias funcionales de las variantes alélicas del promotor del gen *DDIT3*”).

En cuanto a los otros genes de este módulo para los que se ha visto asociación con la EA, *DNAJB9* codifica para una chaperona de la maquinaria del RE, de forma que polimorfismos que afecten a la capacidad de respuesta o a la función de esta proteína podría generar susceptibilidad para la EA si, de acuerdo con la hipótesis de trabajo, el Estrés de Retículo Endoplásmico participa en la patogénesis de la EA.

También hemos encontrado asociación con la EA de SNPs situados en regiones posiblemente reguladoras del gen *HYOU1* (en 3' del mismo y en 3'UTR) en mujeres. Puesto que es un gen de respuesta a ERE, alteraciones en la capacidad de respuesta a este estrés podrían generar susceptibilidad para la EA.

En <http://www.alzgene.org> no hay información que asocie este gen con la EA.

### **GENES RELACIONADOS CON LA RESPUESTA INTEGRADA A ESTRÉS**

En cuanto a *MAP1LC3B*, es un gen relacionado con autofagia, que constituye un mecanismo de supervivencia neuronal. En estados patológicos del sistema nervioso se ha observado un incremento en el número de autofagosomas y vacuolas autofágicas que indican

algún tipo de alteración en el proceso autofágico que podría contribuir a la patogénesis de estas enfermedades neurodegenerativas (Bursch y cols. 2005; Rubinsztein y cols. 2005; Martinez-Vicente y cols. 2007).

Pudimos observar una asociación con la EA replicada del SNP [rs11117269](#), de la región promotora del gen, que indicaba que los individuos homocigotos para el alelo C tenían un riesgo asociado muy significativo frente a la EA.

Este riesgo podría estar relacionado con el hecho de que la edad de aparición de los síntomas se adelantaba conforme aumentaba la dosis alélica del alelo C: como se trata de un polimorfismo de la región promotora, es posible que, debido a diferentes niveles de actividad transcripcional, y, por consiguiente, de proteína, haya una degeneración celular proporcional a la dosis alélica de C y que sea el motivo del riesgo observado.

No hay información previa que asocie este gen con la EA.

### **GENES INDUCIDOS POR ESTRÉS ADRENÉRGICO**

Para determinar la posible implicación de este módulo funcional en la susceptibilidad para desarrollar la EA, nos centramos en los genes que mostraban mayores cambios en la expresión y que representaban distintas funciones: *ARIDA4* (de ciclo celular), *IFT74* (de fusión vesicular), *TMC5* y *DSC1*.

Lo más destacable fue el riesgo encontrado en el gen *DSC1*, tanto en la muestra de referencia como en la de réplica de España - Cataluña, donde se encontró un efecto protector de los individuos portadores del alelo 2 (genotipos AG y GG ) respecto a los individuos homocigotos AA. El hecho de que solamente se observe el efecto protector en hombres pero no en mujeres podría ser uno de los factores responsables de la menor incidencia y/o de las diferentes manifestaciones clínicas que se dan en varones respecto a mujeres (Barnes y cols. 2005).

En cuanto a las posibles funciones de *DSC1* en EA, es importante mencionar que este gen es un miembro de una superfamilia de moléculas de adhesión celular dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  que median la unión célula-célula e interaccionan con el citoesqueleto (Getsios y cols. 2004). Recientemente se ha visto que las desmocolinas son reguladas por factores de transcripción de la familia C/EBP (Smith y cols. 2004), y que estas proteínas tienen actividad inducible por cAMP y se unen a motivos CRE (Bakker y cols. 1991).

En resumen, podemos encontrar un SNP de *DSC1* asociado a la EA de manera dependiente del género que refuerza la hipótesis de la posible implicación de las vías de señalización adrenérgica en la patogénesis de esta enfermedad.

En <http://www.alzgene.org> solamente aparece un artículo que indique alguna asociación



de estos genes, y es el publicado por nuestro grupo de trabajo (Ramos y cols. 2006).

### **GENES INDUCIDOS POR SOBREEXPRESIÓN DE APP**

De los genes analizados en este módulo funcional, se replicó la asociación del SNP [rs4075349](#), del promotor de *IGFBP7*. Se trata de un gen que tiene un papel importante en la parada de la proliferación celular de ciertos cánceres aumentando la muerte celular por un mecanismo similar a la senescencia (Wilson y cols. 2002).

En <http://www.alzgene.org> no se encuentran datos referentes a asociación con la EA de ninguno de los genes de este conjunto estudiados por nuestro grupo de trabajo.

### **OTROS GENES**

Respecto a los polimorfismos analizados en el gen de la Presenilina 1, no hay estudios previos sobre el SNP del Intrón 7 en relación con la EA. Sin embargo, sí es posible encontrar numerosas referencias acerca de la asociación del SNP del Intrón 8 con la EA en diferentes poblaciones. No hay estudios previos sobre el SNP del Intrón 7 de *PSEN1* en relación con la EA. Sí es posible encontrar numerosas referencias acerca de la asociación del SNP del Intrón 8 con la EA en diferentes poblaciones con resultados contradictorios: asociando uno u otro alelo, o no observando asociación (<http://www.alzgene.org/>).

En las bases de datos de PupaSuite y de Chip Mapper (<http://pupasuite.biinfo.cipf.es> y <http://mapper.chip.org/>) los SNPs analizados no aparecen como modificadores de alguna función, por lo que actualmente no es posible determinar las bases biológicas por las que modulan la susceptibilidad para la EA.

Es posible que los SNPs analizados en este trabajo estén ligados a otro(s) SNP(s) del gen *PSEN1* que sean los factores de riesgo reales, y, de esta manera, estarían actuando como marcadores de estos SNPs de riesgo. En este sentido, está establecido que cuando la asociación de un polimorfismo se debe a un desequilibrio de ligamiento con otro SNP, que es el factor de riesgo real, es posible encontrar datos contradictorios acerca de la asociación del polimorfismo ligado en función de la historia genética de las poblaciones analizadas.

Alteraciones en el metabolismo de la Homocisteína (Hcy) producen unos niveles elevados de este aminoácido, que en concentraciones altas es neurotóxico (Obeid y cols. 2006). Se ha descrito que los niveles de Hcy en plasma son mayores en pacientes de EA que en individuos controles (Clarke y cols. 1998).

El gen *MTHFR* es clave en el metabolismo de Hcy. Se ha descrito que los polimorfismos

estudiados en el gen *MTHFR* pueden alterar el correcto funcionamiento de la enzima, de forma que se podría acumular Hcy en plasma: el cambio C677T provoca un cambio de aminoácido Val por Ala en el codón 222, en el dominio catalítico de la enzima, que en homocigosis resulta en unos niveles elevados de Hcy y niveles disminuidos de folato en plasma y en orina (Frosst y cols. 1995). El cambio A1298C provoca un cambio de aminoácido Ala por Glu en el codón 429, en la región reguladora de la enzima, y se trata de un cambio que por sí mismo no tiene efectos detectables sobre los niveles de Hcy. Sin embargo, la heterocigosidad en ambos sitios polimórficos resulta en unos niveles de Hcy y folato similares a los observados en los individuos con el sitio C677T en homocigosis para el alelo T (van der Put y cols. 1998).

Aunque en la bibliografía podemos encontrar trabajos en los que no se detecta asociación de este gen con la EA (Brunelli y cols. 2001), en otros trabajos sí se describe una asociación en el mismo sentido que la detectada por nosotros: una protección del alelo 1298-C (Wakutani y cols. 2004; Bertram y cols. 2007).

Curiosamente, los datos obtenidos de los estudios de asociación muestran que los alelos que generan susceptibilidad para la EA son los que producen niveles menores de Hcy en sangre. Para tratar de esclarecer la posible asociación del metabolismo de Hcy con la EA, actualmente se está estudiando en nuestro laboratorio un modelo celular sometido a concentraciones de hiperhomocisteinemia moderada y alteraciones en el ciclo del folato (Tenorio Vela 2007).

En cuanto al gen *MTRR* aunque no se encuentra información acerca de asociaciones directas con la EA, sí se encuentra que el alelo para el que observábamos tendencia a la asociación (G), está relacionado con niveles ligeramente más elevados de Hcy en plasma, si bien esta alteración en la homocisteinemia no era significativa (Kluijtmans y cols. 2003).

Las proteínas 14-3-3 están relacionadas con la EA, ya que intervienen en la fosforilación de la proteína Tau y en la generación de los ovillos neurofibrilares (Sugimori y cols. 2007). Además, se ha descrito la presencia de la isoforma  $\beta$  (*YWHAB*) en estos ovillos (Layfield y cols. 1996). De esta manera, polimorfismos en isoformas de esta familia multigénica podrían alterar la expresión o el correcto funcionamiento de alguna de estas proteínas y afectar a la susceptibilidad para el desarrollo de la EA.

El gen *YWHAB* mostró asociación con la EA en los individuos portadores de ApoE4. Interesantemente, la asociación se encontraba restringida al mismo estrato poblacional en el que un estudio previo del laboratorio había visto asociación de un SNP del gen *MAPT*, que codifica para la proteína Tau (Bullido y cols. 2000b). En conjunto, estos datos sugieren que la fosforilación de tau característica de la EA podría estar modulada por el genotipo *APOE*.



A día de hoy, no se encuentran datos de asociación de genes codificantes para ningún miembro de esta familia multigénica con la EA.

La vinculación con la EA esporádica de genes relacionados con la EA familiar, como los modulados por el estímulo “sobreexpresión de APP”, así como la asociación ya descrita del gen de la Presenilina 1, refuerzan la hipótesis de que existen mecanismos patogénicos comunes entre ambas formas de EA.

## 6.2. Consecuencias funcionales de las variantes alélicas del promotor del gen *DDIT3*

El estudio de asociación mostró que este SNP ([rs3847699](#)) estaba asociado con la edad de aparición de los síntomas de la EA. Dada la relevancia de este gen en el proceso de apoptosis, decidimos desarrollar un análisis funcional del polimorfismo.

Con el fin de analizar la repercusión funcional de las variaciones de secuencia en el promotor de *DDIT3*, nos pareció de interés estudiar si este polimorfismo podría causar diferencias a nivel de expresión del gen, en ensayos de transfección transitoria y de transfección estable en células neuronales SK-N-MC, tanto en condiciones basales de cultivo como en condiciones de distintos estreses relacionados con la EA.

En los ensayos de transfección transitoria, los resultados obtenidos indicarían que no hay diferencias entre ambas variantes alélicas en cuanto a que se observa una respuesta similar a todos los estímulos analizados. Todos los estímulos a los que se ha sometido las células permiten ver una alteración de la actividad promotora a partir de las 6 horas de tratamiento; en concreto, la actividad transcripcional observada tras los tratamientos con el sistema Xantina / Xantina-Oxidasa, que genera EO, con Tunicamicina, para producir ERE, y con ambos tratamientos conjuntamente, que genera RIE, aumenta significativamente, con un comportamiento similar al observado para el promotor de *DDIT3* endógeno, según datos previos del laboratorio, donde se observaba un ligero incremento en los niveles de ARN mensajero de *DDIT3* en respuesta a EO, un incremento mayor en respuesta a ERE y un efecto sinérgico de ambos tratamientos en respuesta a RIE (Vicente Cenzano 2007).

Sin embargo, en los resultados de estos ensayos se observó una gran variabilidad experimental para ambas variantes alélicas, reflejados en las gráficas correspondientes a los mismos como unas barras de error considerables. Esta variabilidad podría ser debida a la dificultad que entraña la propia técnica de transfección, en cuanto a que la eficiencia de la misma depende de numerosos factores ajenos al proceso de transfección, como todos aquellos que puedan afectar al estado general de las células en el momento de la transfección.

Otro efecto que podría contribuir a esta variabilidad en los resultados podría ser que la actividad transcripcional de esta región promotora se viera afectada por el propio proceso

de transfección. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que ya era posible apreciar una alteración en los niveles de actividad luciferasa en el tiempo 0 de tratamiento, no observándose exactamente los mismos niveles de actividad transcripcional en las diferentes condiciones de cultivo; esta diferencia es más acusada en el caso de la variante -1507G.

Este resultado podría sugerir que ya hay una modulación de la actividad transcripcional previa al tratamiento celular que puede afectar a toda la cinética. Por ello, nos planteamos el desarrollo de líneas celulares que expresen de forma estable la actividad luciferasa bajo la regulación de este promotor de *DDIT3*, de forma que evitaríamos la variabilidad experimental descrita, ya fuere debida al proceso de transfección o a que éste afectara a la actividad transcripcional del gen *DDIT3*.

Uno de los primeros aspectos destacables en los resultados obtenidos es que en estas líneas celulares ya establecidas y recuperadas del proceso de la transfección, a 0 horas de tratamiento, todas las condiciones de cultivo analizadas tienen una actividad transcripcional similar, lo que confirmaría la hipótesis de que era el propio proceso de transfección el que estaba afectando a la actividad promotora en las transfecciones transitorias.

En cuanto a los aspectos destacables referidos a la actividad transcripcional observada para cada variante alélica, el primero es que, si bien la actividad en condiciones de cultivo basales no se diferencia entre ellas, la respuesta a los estímulos sí es diferente. En concreto, si bien para ambas variantes se dispara la expresión en respuesta a ERE, en el caso de la variante -1507G esta respuesta es ligeramente menor que en el caso de la variante -1507C, igualándose los niveles de expresión de ambas variantes en respuesta a RIE, posiblemente debido a cierta sensibilidad de la variante -1507G a EO que no se encuentra en el caso de la variante -1507C. Estas variaciones en la respuesta podrían estar debidas a que en la posición donde se encuentra el polimorfismo [rs3847699](#) hubiera un sitio de unión de factores de transcripción relacionados con la respuesta a los estímulos.

Analizando la secuencia de la región promotora del gen *DDIT3* en el programa ChipMapper (<http://bio.chip.org/mapper>), podemos encontrar diferencias respecto a los factores de transcripción que se unen a esta secuencia en función de la variante alélica en -1507. Encontramos que los factores de transcripción humanos RREB-1 y LBP-1c/CP2/LSF (CP2) se podrían unir a la región entre las posiciones de -1500 a -1519 y de -1505 a -1515, respectivamente, pero solamente en el caso de que la variante alélica presente sea G.

Analizando en el programa PupaSuite (<http://pupasuite.bioinfo.cipf.es>) los polimorfismos que puedan afectar a funciones en la región promotora de *DDIT3* se confirma el hecho de que este SNP se encuentra en un sitio de unión del factor de transcripción CP2. El factor de transcripción CP2 (gen *TFCP2*, localización 12q13) ha sido relacionado con la EA: se ha descrito una asociación entre un polimorfismo (A/G) de la región 3'UTR del gen y la enfermedad. Se ha visto que la región 3'UTR se une a proteínas, de manera que el alelo A, protector frente a la EA, tienen una unión más débil que el alelo G. Este factor regula la

expresión de otros genes que ya han sido relacionados con la EA (GSK3,  $\alpha$ -2macroglobulina, NF $\kappa$ B, interleukina 1 o TNF), puede modular la activación de distintos virus, como HSV-1, e interacciona con la proteína Fe65, que regula la internalización y el procesamiento del APP (Lambert y cols. 2000; Lendon y cols. 2001; Panza y cols. 2004).

Es posible que el polimorfismo estudiado en la región promotora de *DDIT3* tenga una repercusión en la capacidad de respuesta de este gen a estímulos porque afecte la unión de este factor de transcripción, modulando así a la susceptibilidad del individuo de desarrollar la EA.

### 6.3. Hipótesis sobre el papel del polimorfismo del promotor del gen *DDIT3* sobre la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer

En los últimos años se han presentado numerosos datos que sugieren la participación del EO en la patogenia de la EA. Éstos incluyen la demostración de un aumento de los procesos oxidativos de lípidos, proteínas y ADN, alteraciones en las concentraciones de algunos factores prooxidantes y antioxidantes en el cerebro y en otros tejidos, alteraciones de la función mitocondrial y del papel del amiloide y su proteína precursora en los procesos oxidativos en modelos experimentales (cultivos de neuronas corticales y animales transgénicos).

El RE es un compartimento subcelular que juega un papel principal en la modificación post-traducciona de las proteínas. Las proteínas que no se procesan correctamente se acumulan como proteínas mal plegadas que se procesan por la maquinaria de degradación de proteínas asociada al RE (ERAD, *endoplasmic reticulum-associated protein degradation*). Cuando la cantidad de estas proteínas supera la capacidad de degradación, las células de mamífero activan un mecanismo de defensa denominada ERE, que consta fundamentalmente de 4 mecanismos: atenuación de la síntesis de proteínas para evitar el acúmulo de más proteínas mal plegadas, inducción transcripcional de genes de chaperonas del RE para aumentar la capacidad de plegamiento, inducción transcripcional de ERAD para aumentar esta capacidad y, por último, inducción de apoptosis de las células dañadas por este ERE para asegurar así la supervivencia del organismo. Una disfunción de la respuesta ERE causada por el envejecimiento, mutaciones genéticas o factores ambientales pueden desembocar en diferentes enfermedades conocidas colectivamente como “enfermedades conformacionales”, como diabetes, inflamación y desórdenes neurodegenerativos, como EA, EP y desorden bipolar (Yoshida 2007).

En situaciones de ERE se induce la activación de PERK, que fosforila el factor EIF2 $\alpha$ , inactivándolo, para conducir a una atenuación traduccional. El factor EIF2 $\alpha$  también puede ser fosforilado por otras kinasas que se activan en presencia de ciertas infecciones virales, privación de aminoácidos o déficit en grupos hemo, indicando que la atenuación traduccional no se induce exclusivamente en condiciones de ERE, sino también en otras

condiciones fisiológicas. La respuesta celular mediada por la fosforilación del factor EIF2 $\alpha$  se denomina Respuesta Integrada a Estrés (Boyce y cols. 2005; Cnop y cols. 2007).

Curiosamente, la traducción del factor de transcripción ATF4 se estimula mediante esta atenuación vía EIF2 $\alpha$  fosforilado, de forma que el factor ATF4 no puede ser traducido en ausencia de ERE. Una de las dianas de ATF4 es *DDIT3*, un factor de transcripción cuya sobreexpresión promueve la parada del ciclo celular y conduce a las células a apoptosis (Friedman 1996), mientras que deficiencias en la expresión de esta proteína parecen proteger a las células de la apoptosis producida por ERE (Zinszner y cols. 1998; Marciniak y cols. 2004).

En el análisis funcional del polimorfismo de la región promotora de *DDIT3* hemos observado una capacidad de respuesta a estímulos diferente en función de la variante alélica analizada. Nuestros resultados experimentales indican una respuesta a EO en el caso de la variante -1507G que no se observa para la variante -1507C, lo que conduce a una mayor actividad transcripcional del promotor con esta variante polimórfica en respuesta a EO, lo que conferiría a las células una mayor predisposición a la apoptosis dirigida por este gen en condiciones de EO.

Este hecho podría explicar que el riesgo asociado en individuos de edad avanzada con la EA al hecho de ser portador del alelo G en este sitio polimórfico, porque se trata de individuos que, por el mismo proceso de envejecimiento, presentan un EO intrínseco que produciría unos niveles transcripcionales superiores que en el caso del alelo protector, C. Esto podría darse si hubiese un factor activador de la transcripción que se activara en respuesta a EO y que se uniera exclusivamente a la variante polimórfica -1507G, como podría ocurrir con CP2.

Por otra parte, en respuesta a ERE hemos observado que, si bien ambas variantes presentan capacidad de respuesta transcripcional, ésta es mayor en el caso de -1507C. Unos niveles de ERE suficientemente elevados como para conducir a las células a apoptosis se encuentran en individuos con sobrecarga del RE, como podría ser el caso de individuos con mutaciones o con infecciones víricas. En este caso, la alteración funcional producida por la sobrecarga de retículo endoplásmico sería lo suficientemente fuerte como para alcanzar unos niveles de Chop que condujesen las células a apoptosis.

Esta sobreexpresión de *DDIT3* en respuesta a ERE podría explicar el efecto observado de interacción entre el polimorfismo y la edad de aparición de los síntomas: en los individuos maduros más jóvenes puede haber una sobrecarga del RE que conduzca a ERE, pero aún no se ha producido el EO debido al envejecimiento. De este modo, los individuos homocigotos para la variante alélica -1507C presentarían unos niveles de expresión de *DDIT3* mayor que la de los individuos portadores de la variante -1507G de su misma edad que abocara a las células a apoptosis, adelantando así la edad de aparición de los síntomas de la enfermedad.

En respuesta a RIE se igualan los niveles transcripcionales en ambas variantes alélicas,

obteniendo niveles transcripcionales máximos. Como se trata de una convergencia de estreses, oxidativo y de RE, probablemente estén actuando múltiples factores de transcripción que, en su totalidad, enmascaren el efecto diferencial en la actividad transcripcional en función de la variante alélica presentada.

- o O o -

En resumen, en el presente trabajo hemos encontrado diferentes factores genéticos de riesgo para la Enfermedad de Alzheimer. Puesto que los genes candidatos surgen a partir de modelos de neurodegeneración puestos a punto en el laboratorio, estas asociaciones validarían los diferentes modelos en cuanto a la correcta simulación de diferentes mecanismos patogénicos que desembocan en la enfermedad.

Además, hemos realizado el análisis funcional de uno de estos factores genéticos, observando alteraciones en la función que podría verse afectada por esta variante genética. De la misma manera, el análisis funcional de los cambios que produce una variante alélica determinada permitirá esclarecer al menos una de las causas de la enfermedad.

El conocimiento de los diferentes procesos patogénicos que intervienen en mayor medida en cada paciente permitirá “afinar” posibles dianas terapéuticas para evitar o retrasar máximamente el comienzo de la misma, según el perfil genético de cada individuo.



---

## CONCLUSIONES

---





## 7. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se derivan de este trabajo son las siguientes:

1. El estudio de 56 polimorfismos en 30 genes y en 3 muestras caso-control independientes ha permitido definir 15 polimorfismos en 10 genes como nuevos factores de susceptibilidad para el desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer. Además, otros 8 polimorfismos en 5 genes mostraron asociación con la enfermedad en la muestra de referencia, por lo que son también posibles factores de riesgo que quedan pendientes de confirmación en las muestras de réplica.
2. El virus *Herpes Simplex Virus* tipo I juega un papel importante en la patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer, ya que todos los genes estudiados por su implicación en la infección (*EIF2AK2*, *PVRL2* y *TAP2*) mostraron asociación. Además, estos polimorfismos también pueden modular la edad de aparición de los síntomas de la enfermedad.
3. La capacidad de respuesta celular al Estrés Oxidativo, al de Retículo Endoplásmico y a la combinación de ambos, así como al Estrés Adrenérgico influye en la susceptibilidad para padecer la Enfermedad de Alzheimer. Los resultados positivos de asociación (en los genes *PLA2G3* y *HMGCR*, *DDIT3*, *MAP1LC3B* y *DSC1*, respectivamente) vinculan todos estos procesos a la patogénesis de la enfermedad. Por otra parte, la asociación apoya la validez de los modelos celulares como simuladores de los procesos patogénicos relacionados con la Enfermedad de Alzheimer.
4. Genes implicados en la forma monogénica de la Enfermedad de Alzheimer, como *PSEN1*, y genes relacionados con la sobreexpresión de APP (*IGFBP7* y *COL6A3*), están asociados con la Enfermedad de Alzheimer esporádica. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que existen mecanismos patogénicos comunes entre ambas formas de la enfermedad.
5. Hemos determinado que un polimorfismo situado en el promotor de *DDIT3*, que modula la susceptibilidad y la edad de inicio de la Enfermedad de Alzheimer, modula también la capacidad de respuesta de este promotor al Estrés Oxidativo y al de Retículo Endoplásmico, y que la variante alélica que produce mayor actividad transcripcional está asociada a un mayor riesgo o a un adelantamiento en la edad de inicio.
6. Hemos generado una herramienta útil para ensayar la activación del gen *DDIT3* e, indirectamente, por ser éste un testigo de la muerte celular por apoptosis, para ensayar la capacidad neurotóxica o neuroprotectora de compuestos.



---

## BIBLIOGRAFÍA

---



## 8. BIBLIOGRAFÍA

- (1997). "Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer's disease. The National Institute on Aging, and Reagan Institute Working Group on Diagnostic Criteria for the Neuropathological Assessment of Alzheimer's Disease". *Neurobiol Aging* 18 (4 Suppl): S1-2.
- Abraham, J., Earl, H.M., Pharoah, P.D. y Caldas, C. (2006). "Pharmacogenetics of cancer chemotherapy". *Biochim Biophys Acta* 1766 (2): 168-83.
- Aldudo, J., Bullido, M.J., Frank, A. y Valdivieso, F. (1997). "Presenilin-1 genotype (2/2) is associated with late-onset Alzheimer's disease in Spanish patients". *Alzheimer's Research* 3: 141-144.
- Amaducci, L. y Tesco, G. (1994). "Aging as a major risk for degenerative diseases of the central nervous system". *Curr Opin Neurol* 7 (4): 283-6.
- Andersen, J.K. (2004). "Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?" *Nat Med* 10 Suppl: S18-25.
- Artiga, M.J., Bullido, M.J., Frank, A., Sastre, I., Recuero, M., Garcia, M.A., Lendon, C.L., Han, S.W., Morris, J.C., Vazquez, J., Goate, A. y Valdivieso, F. (1998a). "Risk for Alzheimer's disease correlates with transcriptional activity of the APOE gene". *Hum Mol Genet* 7 (12): 1887-92.
- Artiga, M.J., Bullido, M.J., Sastre, I., Recuero, M., Garcia, M.A., Aldudo, J., Vazquez, J. y Valdivieso, F. (1998b). "Allelic polymorphisms in the transcriptional regulatory region of apolipoprotein E gene". *FEBS Lett* 421 (2): 105-8.
- Bakker, O. y Parker, M.G. (1991). "CAAT/enhancer binding protein is able to bind to ATF/CRE elements". *Nucleic Acids Res* 19 (6): 1213-7.
- Balin, B.J. y Appelt, D.M. (2001). "Role of infection in Alzheimer's disease". *J Am Osteopath Assoc* 101 (12 Suppl Pt 1): S1-6.
- Balin, B.J., Gerard, H.C., Arking, E.J., Appelt, D.M., Branigan, P.J., Abrams, J.T., Whittum-Hudson, J.A. y Hudson, A.P. (1998). "Identification and localization of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's brain". *Med Microbiol Immunol* 187 (1): 23-42.
- Barnes, L.L., Wilson, R.S., Bienias, J.L., Schneider, J.A., Evans, D.A. y Bennett, D.A. (2005). "Sex differences in the clinical manifestations of Alzheimer disease pathology". *Arch Gen Psychiatry* 62 (6): 685-91.
- Bauer, D. y Tampe, R. (2002). "Herpes viral proteins blocking the transporter associated with antigen processing TAP--from genes to function and structure". *Curr Top Microbiol Immunol* 269: 87-99.
- Bernard, P.S., Lay, M.J. y Wittwer, C.T. (1998). "Integrated amplification and detection of the C677T point mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves". *Anal Biochem* 255 (1): 101-7.
- Bernard, P.S. y Wittwer, C.T. (2000). "Homogeneous amplification and variant detection by fluorescent hybridization probes". *Clin Chem* 46 (2): 147-8.
- Bertram, L., McQueen, M.B., Mullin, K., Blacker, D. y Tanzi, R.E. (2007). "Systematic meta-

- analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database*". Nat Genet 39 (1): 17-23.
- Bertram, L. y Tanzi, R.E. (2004). "The current status of Alzheimer's disease genetics: what do we tell the patients?" Pharmacol Res 50 (4): 385-96.
- Bertram, L. y Tanzi, R.E. (2005). "The genetic epidemiology of neurodegenerative disease". J Clin Invest 115 (6): 1449-57.
- Bi, M., Naczki, C., Koritzinsky, M., Fels, D., Blais, J., Hu, N., Harding, H., Novoa, I., Varia, M., Raleigh, J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Bell, J., Ron, D., Wouters, B.G. y Koumenis, C. (2005). "ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth". Embo J 24 (19): 3470-81.
- Blackhall, F.H., Howell, S. y Newman, B. (2006). "Pharmacogenetics in the management of breast cancer -- prospects for individualised treatment". Fam Cancer 5 (2): 151-7.
- Blennow, K., de Leon, M.J. y Zetterberg, H. (2006). "Alzheimer's disease". Lancet 368 (9533): 387-403.
- Boyce, M., Bryant, K.F., Jousse, C., Long, K., Harding, H.P., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Ma, D., Coen, D.M., Ron, D. y Yuan, J. (2005). "A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress". Science 307 (5711): 935-9.
- Brookes, A.J. (2001). "Rethinking genetic strategies to study complex diseases". Trends Mol Med 7 (11): 512-6.
- Brunelli, T., Bagnoli, S., Giusti, B., Nacmias, B., Pepe, G., Sorbi, S. y Abbate, R. (2001). "The C677T methylenetetrahydrofolate reductase mutation is not associated with Alzheimer's disease". Neurosci Lett 315 (1-2): 103-5.
- Brunkan, A.L. y Goate, A.M. (2005). "Presenilin function and gamma-secretase activity". J Neurochem 93 (4): 769-92.
- Bullido, M.J., Artiga, M.J., Recuero, M., Sastre, I., Garcia, M.A., Aldudo, J., Lendon, C., Han, S.W., Morris, J.C., Frank, A., Vazquez, J., Goate, A. y Valdivieso, F. (1998). "A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia". Nat Genet 18 (1): 69-71.
- Bullido, M.J., Guallar-Castillon, P., Artiga, M.J., Ramos, M.C., Sastre, I., Aldudo, J., Frank, A., Coria, F., Rodriguez-Artalejo, F. y Valdivieso, F. (2000a). "Alzheimer's risk associated with human apolipoprotein E, alpha-2 macroglobulin and lipoprotein receptor related protein polymorphisms: absence of genetic interactions, and modulation by gender". Neurosci Lett 289 (3): 213-6.
- Bullido, M.J., Aldudo, J., Frank, A., Coria, F., Avila, J. y Valdivieso, F. (2000b). "A polymorphism in the tau gene associated with risk for Alzheimer's disease". Neurosci Lett 278 (1-2): 49-52.
- Bullido, M.J., Ramos, M.C., Ruiz-Gomez, A., Tutor, A.S., Sastre, I., Frank, A., Coria, F., Gil, P., Mayor, F., Jr. y Valdivieso, F. (2004). "Polymorphism in genes involved in adrenergic signaling associated with Alzheimer's". Neurobiol Aging 25 (7): 853-9.
- Bullido, M.J., Martinez-Garcia, A., Artiga, M.J., Aldudo, J., Sastre, I., Gil, P., Coria, F., Munoz, D.G., Hachinski, V., Frank, A. y Valdivieso, F. (2007a). "A TAP2 genotype associated with

- Alzheimer's disease in APOE4 carriers*". Neurobiol Aging 28 (4): 519-23.
- Bullido, M.J., Martinez-Garcia, A., Tenorio, R., Sastre, I., Munoz, D.G., Frank, A. y Valdivieso, F. (2007b). "*Double stranded RNA activated EIF2 alpha kinase (EIF2AK2; PKR) is associated with Alzheimer's disease*". Neurobiol Aging (In press).
- Burgos, J.S., Ramirez, C., Sastre, I., Bullido, M.J. y Valdivieso, F. (2002). "*Involvement of apolipoprotein E in the hematogenous route of herpes simplex virus type 1 to the central nervous system*". J Virol 76 (23): 12394-8.
- Burgos, J.S., Ramirez, C., Sastre, I., Bullido, M.J. y Valdivieso, F. (2003). "*ApoE4 is more efficient than E3 in brain access by herpes simplex virus type 1*". Neuroreport 14 (14): 1825-7.
- Burgos, J.S., Ramirez, C., Sastre, I., Alfaro, J.M. y Valdivieso, F. (2005). "*Herpes simplex virus type 1 infection via the bloodstream with apolipoprotein E dependence in the gonads is influenced by gender*". J Virol 79 (3): 1605-12.
- Burgos, J.S., Ramirez, C., Sastre, I. y Valdivieso, F. (2006). "*Effect of apolipoprotein E on the cerebral load of latent herpes simplex virus type 1 DNA*". J Virol 80 (11): 5383-7.
- Bursch, W. y Ellinger, A. (2005). "*Autophagy--a basic mechanism and a potential role for neurodegeneration*". Folia Neuropathol 43 (4): 297-310.
- Canevari, L. y Clark, J.B. (2007). "*Alzheimer's disease and cholesterol: the fat connection*". Neurochem Res 32 (4-5): 739-50.
- Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A.Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I. y Selkoe, D.J. (1992). "*Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production*". Nature 360 (6405): 672-4.
- Clarke, R., Smith, A.D., Jobst, K.A., Refsum, H., Sutton, L. y Ueland, P.M. (1998). "*Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease*". Arch Neurol 55 (11): 1449-55.
- Cnop, M., Ladriere, L., Hekerman, P., Ortis, F., Cardozo, A.K., Dogusan, Z., Flamez, D., Boyce, M., Yuan, J. y Eizirik, D.L. (2007). "*Selective inhibition of eukaryotic translation initiation factor 2 alpha dephosphorylation potentiates fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress and causes pancreatic beta-cell dysfunction and apoptosis*". J Biol Chem 282 (6): 3989-97.
- Cohen, M.L., Golde, T.E., Usiak, M.F., Younkin, L.H. y Younkin, S.G. (1988). "*In situ hybridization of nucleus basalis neurons shows increased beta-amyloid mRNA in Alzheimer disease*". Proc Natl Acad Sci U S A 85 (4): 1227-31.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L. y Pericak-Vance, M.A. (1993). "*Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families*". Science 261 (5123): 921-3.
- Cruts, M. y Van Broeckhoven, C. (1998). "*Presenilin mutations in Alzheimer's disease*". Hum Mutat 11 (3): 183-90.
- Chapman, P.F., Falinska, A.M., Knevet, S.G. y Ramsay, M.F. (2001). "*Genes, models and Alzheimer's disease*". Trends Genet 17 (5): 254-61.
- Chow, N., Bell, R.D., Deane, R., Streb, J.W., Chen, J., Brooks, A., Van Nostrand, W., Miano, J.M. y Zlokovic, B.V. (2007). "*Serum response factor and myocardin mediate arterial*



- hypercontractility and cerebral blood flow dysregulation in Alzheimer's phenotype*". Proc Natl Acad Sci U S A 104 (3): 823-8.
- De Strooper, B. (2007). "Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease". EMBO Rep 8 (2): 141-6.
- Dobson, C.B., Wozniak, M.A. y Itzhaki, R.F. (2003). "Do infectious agents play a role in dementia?" Trends Microbiol 11 (7): 312-7.
- Dominguez, D.I., Hartmann, D. y De Strooper, B. (2004). "BACE1 and presenilin: two unusual aspartyl proteases involved in Alzheimer's disease". Neurodegener Dis 1 (4-5): 168-74.
- Fischer, P. y Berner, P. (1991). "Clinical and epidemiological aspects of dementia in the elderly". J Neural Transm Suppl 33: 39-48.
- Folstein, M.F., Folstein, S.E. y McHugh, P.R. (1975). "'Mini-mental state'. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician". J Psychiatr Res 12 (3): 189-98.
- Fountoulakis, M., Cairns, N. y Lubec, G. (1999). "Increased levels of 14-3-3 gamma and epsilon proteins in brain of patients with Alzheimer's disease and Down syndrome". J Neural Transm Suppl 57: 323-35.
- Fratiglioni, L., De Ronchi, D. y Aguero-Torres, H. (1999). "Worldwide prevalence and incidence of dementia". Drugs Aging 15 (5): 365-75.
- Friedman, A.D. (1996). "GADD153/CHOP, a DNA damage-inducible protein, reduced CAAT/enhancer binding protein activities and increased apoptosis in 32D c13 myeloid cells". Cancer Res 56 (14): 3250-6.
- Frosst, P., Blom, H.J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C.A., Matthews, R.G., Boers, G.J., den Heijer, M., Kluijtmans, L.A., van den Heuvel, L.P. y et al. (1995). "A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase". Nat Genet 10 (1): 111-3.
- Gandy, S. (2005). "The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease". J Clin Invest 115 (5): 1121-9.
- Getsios, S., Amargo, E.V., Dusek, R.L., Ishii, K., Sheu, L., Godsel, L.M. y Green, K.J. (2004). "Coordinated expression of desmoglein 1 and desmocollin 1 regulates intercellular adhesion". Differentiation 72 (8): 419-33.
- Glenner, G.G. y Wong, C.W. (1984). "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein". Biochem Biophys Res Commun 120 (3): 885-90.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L. y et al. (1991). "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease". Nature 349 (6311): 704-6.
- Goedert, M. y Spillantini, M.G. (2006). "A century of Alzheimer's disease". Science 314 (5800): 777-81.
- Graves, A.B., White, E., Koepsell, T.D., Reifler, B.V., van Belle, G., Larson, E.B. y Raskind, M. (1990). "The association between head trauma and Alzheimer's disease". Am J Epidemiol 131



(3): 491-501.

Grossman, H., Bergmann, C. y Parker, S. (2006). "*Dementia: a brief review*". Mt Sinai J Med 73 (7): 985-92.

Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calfon, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D.F., Bell, J.C., Hettmann, T., Leiden, J.M. y Ron, D. (2003). "*An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress*". Mol Cell 11 (3): 619-33.

Hardy, J. (1997). "*Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease*". Trends Neurosci 20 (4): 154-9.

Hardy, J. y Orr, H. (2006). "*The genetics of neurodegenerative diseases*". J Neurochem 97 (6): 1690-9.

Harman, D. (2006). "*Alzheimer's disease pathogenesis: role of aging*". Ann N Y Acad Sci 1067: 454-60.

Hashiguchi, M., Sobue, K. y Paudel, H.K. (2000). "*14-3-3zeta is an effector of tau protein phosphorylation*". J Biol Chem 275 (33): 25247-54.

Hyman, B.T. y Trojanowski, J.Q. (1997). "*Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer disease from the National Institute on Aging and the Reagan Institute Working Group on diagnostic criteria for the neuropathological assessment of Alzheimer disease*". J Neuropathol Exp Neurol 56 (10): 1095-7.

Isacsohn, M., Smetana, Z., Ronen, Z.Z., Raveh, D., Diamant, Y., Samueloff, A., Shaya, M., Mendelson, E., Slater, P., Rudenski, B., On, E.B. y Morag, A. (2002). "*A sero-epidemiological study of herpes virus type 1 and 2 infection in Israel*". J Clin Virol 24 (1-2): 85-92.

Itzhaki, R.F., Lin, W.R., Shang, D., Wilcock, G.K., Faragher, B. y Jamieson, G.A. (1997). "*Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease*". Lancet 349 (9047): 241-4.

Itzhaki, R. (2004a). "*Herpes simplex virus type 1, apolipoprotein E and Alzheimer's disease*". Herpes 11 Suppl 2: 77A-82A.

Itzhaki, R.F., Dobson, C.B., Shipley, S.J. y Wozniak, M.A. (2004b). "*The role of viruses and of APOE in dementia*". Ann N Y Acad Sci 1019: 15-8.

Itzhaki, R.F., Wozniak, M.A., Appelt, D.M. y Balin, B.J. (2004c). "*Infiltration of the brain by pathogens causes Alzheimer's disease*". Neurobiol Aging 25 (5): 619-27.

Kajinami, K., Takekoshi, N., Brousseau, M.E. y Schaefer, E.J. (2004). "*Pharmacogenetics of HMG-CoA reductase inhibitors: exploring the potential for genotype-based individualization of coronary heart disease management*". Atherosclerosis 177 (2): 219-34.

Katayama, T., Imaizumi, K., Manabe, T., Hitomi, J., Kudo, T. y Tohyama, M. (2004). "*Induction of neuronal death by ER stress in Alzheimer's disease*". J Chem Neuroanat 28 (1-2): 67-78.

Katzman, R. (1986). "*Alzheimer's disease*". N Engl J Med 314 (15): 964-73.

Kluijtmans, L.A., Young, I.S., Boreham, C.A., Murray, L., McMaster, D., McNulty, H., Strain, J.J., McPartlin, J., Scott, J.M. y Whitehead, A.S. (2003). "*Genetic and nutritional factors contributing to hyperhomocysteinemia in young adults*". Blood 101 (7): 2483-8.

- Lambert, J.C., Goumide, L., Vrieze, F.W., Frigard, B., Harris, J.M., Cummings, A., Coates, J., Pasquier, F., Cotel, D., Gaillac, M., St Clair, D., Mann, D.M., Hardy, J., Lendon, C.L., Amouyel, P. y Chartier-Harlin, M.C. (2000). "*The transcriptional factor LBP-1c/CP2/LSF gene on chromosome 12 is a genetic determinant of Alzheimer's disease*". Hum Mol Genet 9 (15): 2275-80.
- Layfield, R., Fergusson, J., Aitken, A., Lowe, J., Landon, M. y Mayer, R.J. (1996). "*Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease brains contain 14-3-3 proteins*". Neurosci Lett 209 (1): 57-60.
- LeBlanc, A.C., Xue, R. y Gambetti, P. (1996). "*Amyloid precursor protein metabolism in primary cell cultures of neurons, astrocytes, and microglia*". J Neurochem 66 (6): 2300-10.
- Leggatt, G.R. y Frazer, I.H. (2007). "*HPV vaccines: the beginning of the end for cervical cancer*". Curr Opin Immunol 19 (2): 232-8.
- Lendon, C. y Craddock, N. (2001). "*Is LBP-1c/CP2/LSF a disease-modifying gene for Alzheimer's disease?*" Lancet 358 (9287): 1029-30.
- Lendon, C.L., Ashall, F. y Goate, A.M. (1997). "*Exploring the etiology of Alzheimer disease using molecular genetics*". Jama 277 (10): 825-31.
- LePage, R.N., Fosang, A.J., Fuller, S.J., Murphy, G., Evin, G., Beyreuther, K., Masters, C.L. y Small, D.H. (1995). "*Gelatinase A possesses a beta-secretase-like activity in cleaving the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease*". FEBS Lett 377 (2): 267-70.
- Levy-Lahad, E., Wijsman, E.M., Nemens, E., Anderson, L., Goddard, K.A., Weber, J.L., Bird, T.D. y Schellenberg, G.D. (1995). "*A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1*". Science 269 (5226): 970-3.
- Lin, M.T. y Beal, M.F. (2006). "*Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases*". Nature 443 (7113): 787-95.
- Lindholm, D., Wootz, H. y Korhonen, L. (2006). "*ER stress and neurodegenerative diseases*". Cell Death Differ 13 (3): 385-92.
- Livak, K.J. (1999). "*Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay*". Genet Anal 14 (5-6): 143-9.
- Luethy, J.D., Fargnoli, J., Park, J.S., Fornace, A.J., Jr. y Holbrook, N.J. (1990). "*Isolation and characterization of the hamster gadd153 gene. Activation of promoter activity by agents that damage DNA*". J Biol Chem 265 (27): 16521-6.
- MacDonald, A.B. (2007). "*Alzheimer's neuroborreliosis with trans-synaptic spread of infection and neurofibrillary tangles derived from intraneuronal spirochetes*". Med Hypotheses 68 (4): 822-5.
- Mace, S., Cousin, E., Ricard, S., Genin, E., Spanakis, E., Lafargue-Soubigou, C., Genin, B., Fournel, R., Roche, S., Haussy, G., Massey, F., Soubigou, S., Brefort, G., Benoit, P., Brice, A., Campion, D., Hollis, M., Pradier, L., Benavides, J. y Deleuze, J.F. (2005). "*ABCA2 is a strong genetic risk factor for early-onset Alzheimer's disease*". Neurobiol Dis 18 (1): 119-25.
- Mahley, R.W., Nathan, B.P. y Pitas, R.E. (1996). "*Apolipoprotein E. Structure, function, and possible roles in Alzheimer's disease*". Ann N Y Acad Sci 777: 139-45.
- Mahmoudi, M., Curzen, N. y Gallagher, P.J. (2007). "*Atherogenesis: the role of inflammation and*

- infection*". Histopathology 50 (5): 535-46.
- Marciniak, S.J., Yun, C.Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H.P. y Ron, D. (2004). "*CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum*". Genes Dev 18 (24): 3066-77.
- Mariani, E., Polidori, M.C., Cherubini, A. y Mecocci, P. (2005). "*Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview*". J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 827 (1): 65-75.
- Martínez-García, A., Sastre, I., Tenorio, R. y Bullido, M.J. (2004). "*SNP genotyping with FRET probes. Optimizing the resolution of heterozygotes*". Mol Cell Probes 18 (4): 211-4.
- Martinez-Vicente, M. y Cuervo, A.M. (2007). "*Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike*". Lancet Neurol 6 (4): 352-61.
- Mattson, M.P. (2004). "*Pathways towards and away from Alzheimer's disease*". Nature 430 (7000): 631-9.
- Mattson, M.P., Guo, Q., Furukawa, K. y Pedersen, W.A. (1998). "*Presenilins, the endoplasmic reticulum, and neuronal apoptosis in Alzheimer's disease*". J Neurochem 70 (1): 1-14.
- McCudden, C.R., Hains, M.D., Kimple, R.J., Siderovski, D.P. y Willard, F.S. (2005). "*G-protein signaling: back to the future*". Cell Mol Life Sci 62 (5): 551-77.
- McKenna, S.A., Kim, I., Liu, C.W. y Puglisi, J.D. (2006). "*Uncoupling of RNA binding and PKR kinase activation by viral inhibitor RNAs*". J Mol Biol 358 (5): 1270-85.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D. y Stadlan, E.M. (1984). "*Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease*". Neurology 34 (7): 939-44.
- Meyer, M.R., Tschanz, J.T., Norton, M.C., Welsh-Bohmer, K.A., Steffens, D.C., Wyse, B.W. y Breitner, J.C. (1998). "*APOE genotype predicts when--not whether--one is predisposed to develop Alzheimer disease*". Nat Genet 19 (4): 321-2.
- Miklossy, J., Kis, A., Radenovic, A., Miller, L., Forro, L., Martins, R., Reiss, K., Darbinian, N., Darekar, P., Mihaly, L. y Khalili, K. (2006). "*Beta-amyloid deposition and Alzheimer's type changes induced by Borrelia spirochetes*". Neurobiol Aging 27 (2): 228-36.
- Milhavet, O., Martindale, J.L., Camandola, S., Chan, S.L., Gary, D.S., Cheng, A., Holbrook, N.J. y Mattson, M.P. (2002). "*Involvement of Gadd153 in the pathogenic action of presenilin-1 mutations*". J Neurochem 83 (3): 673-81.
- Moller, H.J. y Graeber, M.B. (1998). "*The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological sections*". Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 248 (3): 111-22.
- Morishima-Kawashima, M. y Ihara, Y. (2002). "*Alzheimer's disease: beta-Amyloid protein and tau*". J Neurosci Res 70 (3): 392-401.
- Morris, J.A. y Gardner, M.J. (1988). "*Calculating confidence intervals for relative risks (odds ratios) and standardised ratios and rates*". Br Med J (Clin Res Ed) 296 (6632): 1313-6.

- Nestor, P.J., Scheltens, P. y Hodges, J.R. (2004). "*Advances in the early detection of Alzheimer's disease*". Nat Med 10 Suppl: S34-41.
- Nordeen, S.K. (1988). "*Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers*". Biotechniques 6 (5): 454-8.
- Nowotny, P., Kwon, J.M. y Goate, A.M. (2001). "*SNP analysis to dissect human traits*". Curr Opin Neurobiol 11 (5): 637-41.
- Nunan, J. y Small, D.H. (2000). "*Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases*". FEBS Lett 483 (1): 6-10.
- Obeid, R. y Herrmann, W. (2006). "*Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia*". FEBS Lett 580 (13): 2994-3005.
- Onuki, R., Bando, Y., Suyama, E., Katayama, T., Kawasaki, H., Baba, T., Tohyama, M. y Taira, K. (2004). "*An RNA-dependent protein kinase is involved in tunicamycin-induced apoptosis and Alzheimer's disease*". Embo J 23 (4): 959-68.
- Oyadomari, S., Araki, E. y Mori, M. (2002). "*Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells*". Apoptosis 7 (4): 335-45.
- Oyadomari, S. y Mori, M. (2004). "*Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress*". Cell Death Differ 11 (4): 381-9.
- Panza, F., D'Introno, A., Colacicco, A.M., Capurso, C., Basile, A.M., Torres, F., Capurso, A. y Solfrizzi, V. (2004). "*LBP-1c/CP2/LSF gene polymorphism and risk of sporadic Alzheimer's disease*". J Neurol Neurosurg Psychiatry 75 (1): 166-8.
- Park, J.S., Luethy, J.D., Wang, M.G., Fargnoli, J., Fornace, A.J., Jr., McBride, O.W. y Holbrook, N.J. (1992). "*Isolation, characterization and chromosomal localization of the human GADD153 gene*". Gene 116 (2): 259-67.
- Paschen, W. y Mengesdorf, T. (2005). "*Endoplasmic reticulum stress response and neurodegeneration*". Cell Calcium 38 (3-4): 409-15.
- Peel, A.L. (2004). "*PKR activation in neurodegenerative disease*". J Neuropathol Exp Neurol 63 (2): 97-105.
- Pericak-Vance, M.A., Bebout, J.L., Gaskell, P.C., Jr., Yamaoka, L.H., Hung, W.Y., Alberts, M.J., Walker, A.P., Bartlett, R.J., Haynes, C.A., Welsh, K.A. y et al. (1991). "*Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage*". Am J Hum Genet 48 (6): 1034-50.
- Pericak-Vance, M.A., Grubber, J., Bailey, L.R., Hedges, D., West, S., Santoro, L., Kemmerer, B., Hall, J.L., Saunders, A.M., Roses, A.D., Small, G.W., Scott, W.K., Conneally, P.M., Vance, J.M. y Haines, J.L. (2000). "*Identification of novel genes in late-onset Alzheimer's disease*". Exp Gerontol 35 (9-10): 1343-52.
- Poirier, J. (1994). "*Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease*". Trends Neurosci 17 (12): 525-30.
- Porcellini, E., Calabrese, E., Guerini, F., Govoni, M., Chiappelli, M., Tumini, E., Morgan, K., Chappell, S., Kalsheker, N., Franceschi, M. y Licastro, F. (2007). "*The hydroxy-methylglutaryl CoA reductase promoter polymorphism is associated with Alzheimer's risk and*



- cognitive deterioration*". Neurosci Lett 416 (1): 66-70.
- Ramírez Moreno, C. (2006). "*Implicación de la Apolipoproteína E en la infección hematógena y en la transmisión vertical del virus Herpes Simplex tipo I en ratón*". Tesis Doctoral. Departamento de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid.
- Ramos Martín, M.C. (2004). "*Señalización adrenérgica en la enfermedad de Alzheimer. Asociación de los polimorfismos de los genes ADRB1 y GNB3*". Tesis Doctoral. Departamento de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid.
- Ramos, M.C., Tenorio, R., Martinez-Garcia, A., Sastre, I., Vilella-Cuadrada, E., Frank, A., Rosich-Estrago, M., Valdivieso, F. y Bullido, M.J. (2006). "*Association of DSC1, a gene modulated by adrenergic stimulation, with Alzheimer's disease*". Neurosci Lett 408 (3): 203-8.
- Ranade, K., Chang, M.S., Ting, C.T., Pei, D., Hsiao, C.F., Olivier, M., Pesich, R., Hebert, J., Chen, Y.D., Dzau, V.J., Curb, D., Olshen, R., Risch, N., Cox, D.R. y Botstein, D. (2001). "*High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms*". Genome Res 11 (7): 1262-8.
- Recuero, M., Serrano, E., Bullido, M.J. y Valdivieso, F. (2004). "*Abeta production as consequence of cellular death of a human neuroblastoma overexpressing APP*". FEBS Lett 570 (1-3): 114-8.
- Renvoize, E.B., Awad, I.O. y Hambling, M.H. (1987). "*A sero-epidemiological study of conventional infectious agents in Alzheimer's disease*". Age Ageing 16 (5): 311-4.
- Risch, N.J. (2000). "*Searching for genetic determinants in the new millennium*". Nature 405 (6788): 847-56.
- Rocchi, A., Pellegrini, S., Siciliano, G. y Murri, L. (2003). "*Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review*". Brain Res Bull 61 (1): 1-24.
- Rosich-Estrago, M., Figuera-Terre, L., Mulet-Perez, B., Arrufat-Cardus, M.T., Pascual San Emeterio, A., Arbeola-Rigau, I., Labad-Alquezar, A. y Vilella-Cuadrada, E. (2004). "*Demencia y patrón de deterioro cognitivo: asociación con el alelo epsilon4 allele del gen de la apolipoproteína E*". Rev Neurol 38 (9): 801-7.
- Rubinsztein, D.C., DiFiglia, M., Heintz, N., Nixon, R.A., Qin, Z.H., Ravikumar, B., Stefanis, L. y Tolkovsky, A. (2005). "*Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair*". Autophagy 1 (1): 11-22.
- Saunders, A.M. (2000). "*Apolipoprotein E and Alzheimer disease: an update on genetic and functional analyses*". J Neuropathol Exp Neurol 59 (9): 751-8.
- Saunders, A.M. (2001). "*Gene identification in Alzheimer's disease*". Pharmacogenomics 2 (3): 239-49.
- Schellenberg, G.D., Bird, T.D., Wijsman, E.M., Orr, H.T., Anderson, L., Nemens, E., White, J.A., Bonnycastle, L., Weber, J.L., Alonso, M.E. y et al. (1992). "*Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14*". Science 258 (5082): 668-71.
- Schmidt, S., Pericak-Vance, M.A., Sawcer, S., Barcellos, L.F., Hart, J., Sims, J., Prokop, A.M., van der Walt, J., DeLoa, C., Lincoln, R.R., Oksenberg, J.R., Compston, A., Hauser, S.L.,

- Haines, J.L. y Gregory, S.G. (2006). "*Allelic association of sequence variants in the herpes virus entry mediator-B gene (PVRL2) with the severity of multiple sclerosis*". *Genes Immun* 7 (5): 384-92.
- Schroder, M. y Kaufman, R.J. (2005). "*ER stress and the unfolded protein response*". *Mutat Res* 569 (1-2): 29-63.
- Selkoe, D.J. (2001). "*Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy*". *Physiol Rev* 81 (2): 741-66.
- Serrano Carballal, E. (2003). "*Sobre el papel patogénico del péptido beta amiloide en la enfermedad de Alzheimer*". Tesis Doctoral. Departamento de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid.
- Serrano Sáiz, E. (2007). "*Efecto de la Proteína Presentadora de Antígenos TAP en la infección in vivo del virus Herpes Simplex tipo I y generación de modelos transgénicos para su estudio*." Tesis Doctoral. Departamento de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid.
- Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K. y et al. (1995). "*Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease*". *Nature* 375 (6534): 754-60.
- Smith, C., Zhu, K., Merritt, A., Picton, R., Youngs, D., Garrod, D. y Chidgey, M. (2004). "*Regulation of desmocollin gene expression in the epidermis: CCAAT/enhancer-binding proteins modulate early and late events in keratinocyte differentiation*". *Biochem J* 380 (Pt 3): 757-65.
- St George-Hyslop, P., Haines, J., Rogaev, E., Mortilla, M., Vaula, G., Pericak-Vance, M., Foncin, J.F., Montesi, M., Bruni, A., Sorbi, S. y et al. (1992). "*Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14*". *Nat Genet* 2 (4): 330-4.
- Stern, Y., Gurland, B., Tatemichi, T.K., Tang, M.X., Wilder, D. y Mayeux, R. (1994). "*Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease*". *Jama* 271 (13): 1004-10.
- Stratton, C.W. y Sriram, S. (2003). "*Association of Chlamydia pneumoniae with central nervous system disease*". *Microbes Infect* 5 (13): 1249-53.
- Sugimori, K., Kobayashi, K., Kitamura, T., Sudo, S. y Koshino, Y. (2007). "*14-3-3 protein beta isoform is associated with 3-repeat tau neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease*". *Psychiatry Clin Neurosci* 61 (2): 159-67.
- Tanzi, R.E. y Bertram, L. (2001). "*New frontiers in Alzheimer's disease genetics*". *Neuron* 32 (2): 181-4.
- Teipel, S.J. y Hampel, H. (2006). "*Neuroanatomy of Down syndrome in vivo: a model of preclinical Alzheimer's disease*". *Behav Genet* 36 (3): 405-15.
- Tenorio Vela, R. (2007). "*La homocisteína como factor de riesgo para la Enfermedad de Alzheimer*". Tesis Doctoral. Departamento de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid.
- Thinakaran, G. y Parent, A.T. (2004). "*Identification of the role of presenilins beyond Alzheimer's disease*". *Pharmacol Res* 50 (4): 411-8.

- van der Put, N.M., Gabreels, F., Stevens, E.M., Smeitink, J.A., Trijbels, F.J., Eskes, T.K., van den Heuvel, L.P. y Blom, H.J. (1998). "A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects?" *Am J Hum Genet* 62 (5): 1044-51.
- Vicente Cenzano, M.d.C. (2007). "Convergencia de estrés de retículo endoplásmico y de estrés oxidativo como modelo celular de neurodegeneración". Tesis Doctoral. Departamento de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid.
- Wakutani, Y., Kowa, H., Kusumi, M., Nakaso, K., Yasui, K., Isoe-Wada, K., Yano, H., Urakami, K., Takeshima, T. y Nakashima, K. (2004). "A haplotype of the methylenetetrahydrofolate reductase gene is protective against late-onset Alzheimer's disease". *Neurobiol Aging* 25 (3): 291-4.
- Wang, X.Z., Kuroda, M., Sok, J., Batchvarova, N., Kimmel, R., Chung, P., Zinszner, H. y Ron, D. (1998). "Identification of novel stress-induced genes downstream of chop". *Embo J* 17 (13): 3619-30.
- Wilson, H.M., Birnbaum, R.S., Poot, M., Quinn, L.S. y Swisshelm, K. (2002). "Insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 inhibits proliferation of MCF-7 breast cancer cells via a senescence-like mechanism". *Cell Growth Differ* 13 (5): 205-13.
- Wittwer, C.T., Ririe, K.M., Andrew, R.V., David, D.A., Gundry, R.A. y Balis, U.J. (1997). "The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control". *Biotechniques* 22 (1): 176-81.
- Wolfe, M.S. (2007). "When loss is gain: reduced presenilin proteolytic function leads to increased Abeta42/Abeta40. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease". *EMBO Rep* 8 (2): 136-140.
- Wolozin, B., Kellman, W., Ruosseau, P., Celesia, G.G. y Siegel, G. (2000). "Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors". *Arch Neurol* 57 (10): 1439-43.
- Xu, C., Bailly-Maitre, B. y Reed, J.C. (2005). "Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions". *J Clin Invest* 115 (10): 2656-64.
- Yoshida, H. (2007). "ER stress and diseases". *Febs J* 274 (3): 630-58.
- Zhao, L. y Ackerman, S.L. (2006). "Endoplasmic reticulum stress in health and disease". *Curr Opin Cell Biol* 18 (4): 444-52.
- Zhu, X., Lee, H.G., Perry, G. y Smith, M.A. (2007). "Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: an update". *Biochim Biophys Acta* 1772 (4): 494-502.
- Zhu, X., Raina, A.K., Lee, H.G., Casadesus, G., Smith, M.A. y Perry, G. (2004). "Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease". *Brain Res* 1000 (1-2): 32-9.
- Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R.T., Remotti, H., Stevens, J.L. y Ron, D. (1998). "CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum". *Genes Dev* 12 (7): 982-95.

### **Páginas Web consultadas**

#### Enfermedad de Alzheimer

<http://www.molgen.ua.ac.be/>

<http://www.alzforum.org>

<http://www.alzgene.org>

#### Polimorfismos y Genes

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>

<http://snp.cshl.org>

<http://www.snps3d.org>

<http://pupasuite.bioinfo.cipf.es>

<http://bio.chip.org/mapper>

<http://www.expasy.org/>

<http://www.hapmap.org>

<http://www.pla2.com>

[http://www.anthonynolan.com/HIG/nomen/nomen\\_index.html](http://www.anthonynolan.com/HIG/nomen/nomen_index.html)

[http://www.uam.es/personal\\_pdi/ciencias/gpepe/g-poblaciones/clases/Tema\\_06/desequilibrio-de-ligamiento.htm](http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/gpepe/g-poblaciones/clases/Tema_06/desequilibrio-de-ligamiento.htm)

#### Real Academia de la Lengua Española

<http://www.rae.es>



---

ANEXOS

---

---



---

## ANEXO I

---



GENES RELACIONADOS CON LA INFECCIÓN POR *HERPES SIMPLEX VIRUS* TIPO I

EIF2AK2 <a href="#">rs2254958</a>	España - Centro			España - Cataluña		
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p ( $\chi^2$ )
Todos	Casos 38 (.16)	110 (.46)	93 (.39)	0,7	0,57 – 0,92	0,007
	Controles 81 (.24)	155 (.45)	105 (.31)			
ApoE4 +	Casos 17 (.14)	58 (.48)	45 (.38)	0,6	0,38 – 0,95	0,03
	Controles 11 (.21)	31 (.60)	10 (.19)			
ApoE4 –	Casos 21 (.17)	52 (.43)	48 (.40)	0,8	0,56 – 1,03	0,07
	Controles 70 (.24)	124 (.43)	95 (.33)			
Mujeres	Casos 24 (.16)	68 (.45)	58 (.39)	0,8	0,59 – 1,10	0,18
	Controles 39 (.21)	85 (.46)	62 (.33)			
Varones	Casos 14 (.15)	42 (.16)	35 (.38)	0,7	0,44 – 0,95	0,03
	Controles 32 (.26)	56 (.46)	34 (.28)			
Temprana	Casos 6 (.10)	26 (.44)	27 (.46)	0,6	0,35 – 0,90	0,02
	Controles 23 (.23)	46 (.46)	31 (.31)			
Intermedia	Casos 26 (.17)	74 (.48)	54 (.35)	0,8	0,56 – 1,03	0,08
	Controles 45 (.26)	77 (.44)	53 (.30)			
Tardía	Casos 5 (.24)	6 (.29)	10 (.48)	0,7	0,35 – 1,49	0,37
	Controles 11 (.21)	26 (.50)	15 (.29)			
EIF2AK2 <a href="#">rs2254958</a>	Canadá			A1 vs A2		
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p ( $\chi^2$ )
Todos	Casos 31 (.17)	81 (.45)	69 (.38)	0,9	0,63 – 1,17	0,33
	Controles 32 (.21)	70 (.45)	53 (.34)			
ApoE4 +	Casos 7 (.16)	25 (.58)	11 (.26)	1,4	0,71 – 2,92	0,31
	Controles 2 (.08)	15 (.58)	9 (.35)			
ApoE4 –	Casos 20 (.17)	48 (.40)	53 (.44)	0,7	0,50 – 1,04	0,08
	Controles 27 (.23)	52 (.43)	41 (.34)			
Mujeres	Casos 18 (.17)	49 (.47)	37 (.36)	0,9	0,57 – 1,30	0,48
	Controles 17 (.21)	39 (.48)	26 (.32)			
Varones	Casos 13 (.17)	32 (.42)	32 (.42)	0,8	0,53 – 1,34	0,47
	Controles 15 (.21)	31 (.42)	27 (.37)			
Temprana	Casos 1 (.04)	11 (.42)	14 (.54)	0,4	0,17 – 1,06	0,06
	Controles 4 (.24)	7 (.41)	6 (.35)			
Intermedia	Casos 18 (.24)	31 (.41)	27 (.36)	1	0,67 – 1,51	0,99
	Controles 27 (.22)	56 (.45)	42 (.34)			
Tardía	Casos 1 (.13)	5 (.63)	2 (.25)	1,5	0,41 – 5,26	0,55
	Controles 1 (.08)	7 (.54)	5 (.38)			

EIF2AK2 <a href="#">rs4648174</a>	España - Centro			A1 vs A2		
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p ( $\chi^2$ )
Todos	Casos 44 (.17)	118 (.47)	91 (.36)	0,7	0,56 – 0,89	0,004
	Controles 86 (.24)	178 (.50)	92 (.26)			
ApoE4 +	Casos 17 (.14)	60 (.48)	48 (.38)	0,5	0,34 – 0,85	0,008
	Controles 12 (.22)	33 (.61)	9 (.17)			
ApoE4 –	Casos 27 (.21)	58 (.45)	43 (.34)	0,8	0,62 – 1,11	0,2
	Controles 74 (.25)	145 (.48)	83 (.27)			
Mujeres	Casos 25 (.16)	76 (.48)	59 (.37)	0,8	0,56 – 1,01	0,06
	Controles 42 (.22)	97 (.50)	56 (.29)			
Varones	Casos 19 (.20)	42 (.45)	32 (.34)	0,7	0,46 – 1,04	0,08
	Controles 32 (.25)	69 (.53)	28 (.22)			
Temprana	Casos 10 (.17)	27 (.45)	23 (.48)	0,7	0,44 – 1,10	0,12
	Controles 24 (.24)	49 (.49)	28 (.28)			
Intermedia	Casos 27 (.17)	78 (.48)	57 (.35)	0,7	0,53 – 0,96	0,03
	Controles 47 (.25)	89 (.48)	50 (.27)			
Tardía	Casos 7 (.33)	6 (.29)	8 (.38)	0,8	0,41 – 1,72	0,64
	Controles 13 (.24)	30 (.56)	11 (.20)			

EIF2AK2 <a href="#">rs4648174</a>	España - Cataluña			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%) p (χ <sup>2</sup> )
Todos	Casos 74 (.22)	170 (.50)	98 (.29)	0,9	0,74 – 1,20 0,63
	Controlles 53 (.24)	107 (.48)	62 (.28)		
ApoE4 +	Casos 30 (.17)	83 (.48)	59 (.34)	0,7	0,43 – 1,18 0,19
	Controlles 10 (.28)	16 (.44)	10 (.28)		
ApoE4 –	Casos 44 (.26)	86 (.51)	39 (.23)	1,2	0,87 – 1,57 0,3
	Controlles 43 (.23)	90 (.49)	52 (.28)		
Mujeres	Casos 57 (.23)	119 (.49)	68 (.28)	0,9	0,66 – 1,23 0,5
	Controlles 34 (.29)	52 (.44)	33 (.28)		
Varones	Casos 17 (.17)	51 (.52)	30 (.31)	0,9	0,63 – 1,38 0,72
	Controlles 19 (.18)	55 (.53)	29 (.28)		
Temprana	Casos 5 (.31)	8 (.50)	3 (.19)	1,4	0,62 – 3,30 0,4
	Controlles 11 (.30)	13 (.35)	13 (.35)		
Intermedia	Casos 66 (.21)	157 (.50)	89 (.29)	0,9	0,73 – 1,23 0,67
	Controlles 39 (.22)	90 (.51)	47 (.27)		
Tardía	Casos 3 (.23)	5 (.38)	5 (.368)	0,7	0,20 – 2,70 0,64
	Controlles 2 (.29)	3 (.43)	2 (.29)		
EIF2AK2 <a href="#">rs3770768</a>	España - Cataluña			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%) p (χ <sup>2</sup> )
Todos	Casos 258 (.79)	70 (.21)	0 (.00)	0,9	0,58 – 1,31 0,51
	Controlles 180 (.81)	42 (.19)	0 (.00)		
ApoE4 +	Casos 124 (.76)	39 (.24)	0 (.00)	1	0,42 – 2,13 0,9
	Controlles 27 (.77)	8 (.23)	0 (.00)		
ApoE4 –	Casos 133 (.81)	31 (.19)	0 (.00)	1	0,58 – 1,61 0,89
	Controlles 152 (.82)	34 (.18)	0 (.00)		
Mujeres	Casos 187 (.80)	47 (.20)	0 (.00)	0,8	0,47 – 1,42 0,48
	Controlles 99 (.83)	20 (.17)	0 (.00)		
Varones	Casos 71 (.76)	23 (.24)	0 (.00)	0,9	0,46 – 1,60 0,63
	Controlles 81 (.79)	22 (.21)	0 (.00)		
Temprana	Casos 15 (.94)	1 (.06)	0 (.00)	4,8	0,59 – 39,55 0,11
	Controlles 27 (.73)	10 (.27)	0 (.00)		
Intermedia	Casos 230 (.77)	68 (.23)	0 (.00)	0,8	0,48 – 1,17 0,21
	Controlles 145 (.82)	31 (.18)	0 (.00)		
Tardía	Casos 12 (.92)	1 (.08)	0 (.00)	–	– –
	Controlles 7 (1,00)	0 (.00)	0 (.00)		
EIF2AK2 <a href="#">rs3770768</a>	España - Centro			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%) p (χ <sup>2</sup> )
Todos	Casos 206 (.83)	41 (.17)	0 (.00)	1,1	0,72 – 1,63 0,71
	Controlles 290 (.82)	63 (.18)	0 (.00)		
ApoE4 +	Casos 92 (.77)	28 (.23)	0 (.00)	0,8	0,37 – 1,69 0,54
	Controlles 43 (.81)	10 (.19)	0 (.00)		
ApoE4 –	Casos 114 (.90)	13 (.10)	0 (.00)	1,8	0,96 – 3,36 0,06
	Controlles 247 (.82)	53 (.18)	0 (.00)		
Mujeres	Casos 126 (.81)	29 (.19)	0 (.00)	1,1	0,63 – 1,74 0,86
	Controlles 157 (.81)	38 (.19)	0 (.00)		
Varones	Casos 80 (.87)	12 (.13)	0 (.00)	1,1	0,52 – 2,37 0,78
	Controlles 107 (.86)	18 (.14)	0 (.00)		
Temprana	Casos 50 (.86)	8 (.14)	0 (.00)	1,5	0,63 – 3,48 0,36
	Controlles 81 (.80)	20 (.20)	0 (.00)		
Intermedia	Casos 129 (.81)	30 (.19)	0 (.00)	0,8	0,46 – 1,69 0,4
	Controlles 155 (.85)	28 (.15)	0 (.00)		
Tardía	Casos 19 (.90)	2 (.10)	0 (.00)	2	0,43 – 9,73 0,36
	Controlles 44 (.81)	10 (.19)	0 (.00)		
PVRL2 <a href="#">hCV11711387</a>	España - Centro			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%) p (χ <sup>2</sup> )
Todos	Casos 8 (.03)	51 (.20)	199 (.77)	1	0,74 – 1,45 0,86
	Controlles 4 (.01)	83 (.23)	273 (.76)		
ApoE4 +	Casos 1 (.01)	22 (.17)	105 (.82)	0,9	0,43 – 1,93 0,81
	Controlles 0 (.00)	1 (.20)	43 (.80)		
ApoE4 –	Casos 7 (.05)	29 (.22)	94 (.72)	1,3	0,88 – 1,97 0,18
	Controlles 4 (.01)	72 (.24)	230 (.75)		
Mujeres	Casos 6 (.04)	34 (.21)	123 (.75)	1	0,67 – 1,57 0,9
	Controlles 1 (.01)	52 (.27)	143 (.73)		
Varones	Casos 2 (.02)	17 (.18)	76 (.80)	0,9	0,50 – 1,60 0,7
	Controlles 3 (.02)	26 (.20)	102 (.78)		
Temprana	Casos 1 (.02)	17 (.28)	43 (.70)	1,4	0,72 – 2,65 0,33
	Controlles 1 (.01)	22 (.22)	79 (.77)		
Intermedia	Casos 5 (.03)	31 (.19)	130 (.78)	0,9	0,59 – 1,43 0,71
	Controlles 1 (.01)	48 (.26)	139 (.74)		
Tardía	Casos 2 (.10)	3 (.14)	16 (.76)	1,5	0,55 – 4,04 0,43
	Controlles 0 (.00)	13 (.24)	42 (.76)		

PVRL2 hCV11711387	España - Cataluña			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%) p (χ²)
Todos	Casos 4 (.01)	61 (.18)	268 (.80)	0,7	0,48 – 1,00 0,05
	Controles 4 (.02)	55 (.25)	161 (.73)		
ApoE4 +	Casos 0 (.00)	28 (.17)	141 (.83)	0,5	0,23 – 1,03 0,05
	Controles 0 (.00)	11 (.31)	24 (.69)		
ApoE4 –	Casos 4 (.02)	33 (.20)	129 (.77)	0,9	0,56 – 1,36 0,55
	Controles 4 (.02)	44 (.24)	136 (.74)		
Mujeres	Casos 2 (.01)	41 (.17)	194 (.82)	0,7	0,41 – 1,07 0,09
	Controles 3 (.03)	26 (.22)	88 (.75)		
Varones	Casos 2 (.02)	20 (.21)	74 (.77)	0,8	0,45 – 1,43 0,46
	Controles 1 (.01)	29 (.28)	73 (.71)		
Temprana	Casos 0 (.0)	4 (.27)	11 (.73)	1	0,27 – 3,32 0,94
	Controles 2 (.06)	6 (.17)	28 (.78)		
Intermedia	Casos 4 (.01)	57 (.19)	244 (.80)	0,7	0,48 – 1,06 0,1
	Controles 2 (.01)	46 (.26)	127 (.73)		
Tardía	Casos 0 (.00)	0 (.00)	12 (1.00)	0	- 0,02
	Controles 0 (.00)	3 (.43)	4 (.57)		

PVRL2 rs3745150	España - Cataluña			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%) p (χ²)
Todos	Casos 141 (.41)	152 (.45)	48 (.14)	1,6	1,23 – 2,00 3E-04
	Controles 57 (.26)	119 (.54)	45 (.20)		
ApoE4 +	Casos 90 (.53)	785 (.44)	6 (.04)	1,5	0,86 – 2,62 0,15
	Controles 12 (.365)	21 (.62)	1 (.03)		
ApoE4 –	Casos 50 (.30)	77 (.46)	42 (.25)	1,1	0,81 – 1,46 0,58
	Controles 45 (.24)	97 (.52)	44 (.24)		
Mujeres	Casos 104 (.43)	104 (.43)	35 (.14)	1,8	1,31 – 2,46 3E-04
	Controles 29 (.25)	60 (.51)	29 (.25)		
Varones	Casos 37 (.38)	48 (.49)	13 (.13)	1,3	0,88 – 1,94 0,19
	Controles 28 (.27)	59 (.57)	16 (.16)		
Temprana	Casos 7 (.44)	9 (.56)	0 (.00)	2,4	0,99 – 5,93 0,05
	Controles 12 (.32)	14 (.38)	11 (.30)		
Intermedia	Casos 131 (.42)	135 (.43)	45 (.14)	1,5	1,17 – 1,98 0,002
	Controles 44 (.25)	400 (.57)	31 (.18)		
Tardía	Casos 2 (.15)	8 (.62)	3 (.23)	1,1	0,361 0,84
	Controles 1 (.14)	4 (.57)0	2 (.29)		

PVRL2 rs3745150	España - Centro			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%) p (χ²)
Todos	Casos 95 (.37)	119 (.47)	41 (.16)	1,2	0,98 – 1,55 0,07
	Controles 114 (.32)	167 (.47)	75 (.21)		
ApoE4 +	Casos 70 (.56)	51 (.41)	4 (.03)	1,2	0,73 – 2,07 0,45
	Controles 23 (.45)	28 (.55)	0 (.00)		
ApoE4 –	Casos 25 (.19)	68 (.52)	37 (.28)	0,8	0,56 – 1,00 0,05
	Controles 91 (.30)	139 (.46)	75 (.25)		
Mujeres	Casos 54 (.34)	80 (.50)	27 (.17)	1,4	1,01 – 1,83 0,04
	Controles 54 (.28)	90 (.46)	51 (.26)		
Varones	Casos 41 (.44)	39 (.41)	14 (.15)	1,2	0,84 – 1,83 0,28
	Controles 43 (.33)	67 (.52)	19 (.15)		
Temprana	Casos 17 (.28)	27 (.45)	16 (.27)	0,6	0,41 – 1,01 0,05
	Controles 39 (.38)	48 (.47)	15 (.15)		
Intermedia	Casos 67 (.41)	81 (.49)	16 (.10)	1,8	1,31 – 2,42 2E-04
	Controles 53 (.29)	84 (.46)	47 (.26)		
Tardía	Casos 7 (.33)	7 (.33)	7 (.33)	0,9	0,44 – 1,83 0,76
	Controles 14 (.25)	30 (.55)	11 (.20)		

TAP2 A/B	España - Centro			B vs A	
	AA	AB	BB	OR	IC (95%) p (χ²)
Todos	Casos 112 (.47)	98 (.41)	27 (.11)	1,5	1,12 – 1,91 0,005
	Controles 185 (.57)	120 (.37)	19 (.06)		
ApoE4 +	Casos 53 (.47)	47 (.42)	13 (.12)	1,8	1,03 – 3,19 0,04
	Controles 29 (.60)	18 (.38)	1 (.02)		
ApoE4 –	Casos 59 (.48)	51 (.41)	14 (.11)	1,4	1,01 – 1,95 0,04
	Controles 156 (.57)	102 (.37)	18 (.07)		
Mujeres	Casos 74 (.50)	58 (.39)	17 (.11)	1,2	0,89 – 1,73 0,21
	Controles 109 (.55)	73 (.37)	16 (.08)		
Varones	Casos 38 (.43)	40 (.45)	10 (.11)	1,9	1,24 – 2,97 0,003
	Controles 75 (.60)	47 (.38)	3 (.02)		
Temprana	Casos 24 (.41)	25 (.43)	9 (.16)	1,9	1,09 – 3,21 0,02
	Controles 41 (.58)	26 (.37)	4 (.06)		
Intermedia	Casos 78 (.49)	65 (.41)	15 (.09)	1,4	0,98 – 1,90 0,07
	Controles 114 (.58)	73 (.37)	11 (.06)		
Tardía	Casos 10 (.48)	8 (.38)	3 (.14)	1,4	0,65 – 3,01 0,39
	Controles 30 (.55)	21 (.38)	4 (.07)		

TAP2 A/B			España - Cataluña			B vs A		TAP2 A/B			Canadá			A1 vs A2			
rs241448			AA	AB	BB	OR	IC (95%)	p (χ²)	rs241448			AA	AB	BB	OR	IC (95%)	p (χ²)
Todos	Casos	186 (.55)	133 (.39)	21 (.06)	21 (.06)	0,9	0,72 – 1,23	0,66	Todos	Casos	71 (.63)	28 (.25)	13 (.12)	1,2	0,83 – 1,84	0,29	
	Controles	115 (.52)	93 (.42)	13 (.06)	13 (.06)					Controles	122 (.64)	60 (.31)	9 (.05)				
ApoE4 +	Casos	106 (.62)	54 (.32)	10 (.06)	10 (.06)	1	0,53 – 1,80	0,93	ApoE4 +	Casos	12 (.48)	5 (.20)	8 (.32)	2,1	0,95 – 4,59	0,06	
	Controles	21 (.58)	14 (.39)	1 (.03)	1 (.03)					Controles	18 (.55)	13 (.39)	2 (.06)				
ApoE4 –	Casos	80 (.48)	78 (.46)	10 (.06)	10 (.06)	1,1	0,77 – 1,49	0,67	ApoE4 –	Casos	51 (.68)	20 (.27)	4 (.05)	0,9	0,56 – 1,52	0,74	
	Controles	96 (.51)	78 (.42)	12 (.07)	12 (.07)					Controles	93 (.64)	46 (.32)	6 (.04)				
Mujeres	Casos	135 (.56)	92 (.38)	15 (.06)	15 (.06)	0,9	0,60 – 1,22	0,39	Mujeres	Casos	45 (.66)	16 (.24)	7 (.10)	1	0,56 – 1,63	0,87	
	Controles	59 (.50)	50 (.43)	8 (.07)	8 (.07)					Controles	59 (.63)	30 (.32)	5 (.05)				
Varones	Casos	51 (.52)	41 (.42)	6 (.06)	6 (.06)	1,1	0,70 – 1,69	0,72	Varones	Casos	26 (.59)	12 (.627)	6 (.14)	0,7	0,36 – 1,17	0,15	
	Controles	56 (.54)	43 (.41)	5 (.05)	5 (.05)					Controles	63 (.65)	30 (.31)	4 (.04)				
Temprana	Casos	8 (.50)	8 (.50)	0 (.00)	0 (.00)	1,1	0,43 – 2,94	0,82	Temprana	Casos	17 (.59)	8 (.28)	4 (.14)	1,6	0,59 – 4,32	0,37	
	Controles	21 (.57)	15 (.41)	1 (.03)	1 (.03)					Controles	12 (.67)	5 (.28)	1 (.06)				
Intermedia	Casos	164 (.54)	123 (.40)	21 (.07)	21 (.07)	0,9	0,70 – 1,26	0,7	Intermedia	Casos	49 (.64)	20 (.26)	7 (.09)	1,1	0,69 – 1,76	0,7	
	Controles	91 (.51)	74 (.42)	12 (.07)	12 (.07)					Controles	97 (.63)	50 (.32)	7 (.05)				
Tardía	Casos	11 (.85)	2 (.15)	0 (.00)	0 (.00)	0,2	0,03 – 1,33	0,08	Tardía	Casos	5 (.71)	0 (.00)	2 (.29)	1,8	0,43 – 7,33	0,43	
	Controles	3 (.43)	4 (.57)	0 (.00)	0 (.00)					Controles	13 (.68)	5 (.26)	1 (.05)				
GENES INDUCIDOS POR ESTRÉS OXIDATIVO																	
PLA2G3			España - Centro			A1 vs A2		PLA2G3			España - Centro			A1 vs A2			
rs3788428			A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p (χ²)	rs9619169			A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p (χ²)
Todos	Casos	0 (.00)	32 (8.13)	221 (.87)	221 (.87)	0,9	0,59 – 1,49	0,79	Todos	Casos	87 (.34)	131 (.51)	39 (.15)	1,2	0,98 - 1,54	0,08	
	Controles	0 (.00)	48 (.13)	310 (.87)	310 (.87)					Controles	120 (.33)	152 (.42)	89 (.25)				
ApoE4 +	Casos	0 (.00)	16 (.13)	109 (.87)	109 (.87)	3,4	0,77–15.15	0,09	ApoE4 +	Casos	37 (.29)	73 (.57)	17 (.13)	1,2	0,75 – 1,86	0,46	
	Controles	0 (.00)	2 (.04)	49 (.96)	49 (.96)					Controles	18 (.33)	22 (.41)	14 (.26)				
ApoE4 –	Casos	0 (.00)	16 (.13)	112 (.88)	112 (.88)	0,8	0,46 – 1,48	0,52	ApoE4 –	Casos	50 (.38)	58 (.45)	22 (.17)	1,3	0,97 – 1,74	0,08	
	Controles	0 (.00)	46 (.15)	261 (.85)	261 (.85)					Controles	102 (.33)	130 (.42)	75 (.24)				
Mujeres	Casos	0 (.00)	19 (.12)	140 (.88)	140 (.88)	0,9	0,49 – 1,65	0,72	Mujeres	Casos	84 (.33)	81 (.50)	27 (.17)	1,1	0,84 – 1,52	0,42	
	Controles	0 (.00)	26 (.13)	170 (.87)	170 (.87)					Controles	65 (.33)	88 (.45)	44 (.22)				
Varones	Casos	0 (.00)	13 (.14)	81 (.86)	81 (.86)	1,1	0,53 – 2,40	0,76	Varones	Casos	33 (.35)	50 (.53)	12 (.13)	1,3	0,88 – 1,88	0,2	
	Controles	0 (.00)	16 (.12)	113 (.88)	113 (.88)					Controles	46 (.35)	52 (.40)	33 (.25)				
Temprana	Casos	0 (.00)	8 (.13)	52 (.87)	52 (.87)	0,7	0,30 – 1,66	0,42	Temprana	Casos	22 (.36)	32 (.52)	7 (.11)	1,9	1,20 – 2,99	0,006	
	Controles	0 (.00)	19 (.18)	84 (.82)	84 (.82)					Controles	30 (.29)	36 (.35)	37 (.36)				
Intermedia	Casos	0 (.00)	22 (.14)	140 (.86)	140 (.86)	1,4	0,76 – 2,74	0,26	Intermedia	Casos	52 (.32)	86 (.52)	27 (.16)	1	0,76 – 1,37	0,91	
	Controles	0 (.00)	18 (.10)	169 (.90)	169 (.90)					Controles	66 (.35)	84 (.44)	39 (.21)				
Tardía	Casos	0 (.00)	1 (.05)	21 (.95)	21 (.95)	0,2	0,03 – 1,93	0,15	Tardía	Casos	9 (.43)	9 (.43)	3 (.14)	1,2	0,57 – 2,49	0,64	
	Controles	0 (.00)	10 (.19)	44 (.81)	44 (.81)					Controles	20 (.37)	25 (.46)	9 (.17)				



PLA2G3				España - Cataluña			A1 vs A2		
<a href="#">rs9619169</a>				A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p (χ²)
Todos	Casos	113 (.33)	171 (.50)	59 (.17)	1,1	0.85 – 1.37	0.55		
	Controles	82 (.32)	106 (.48)	45 (.20)					
ApoE4 +	Casos	52 (.30)	2 (.53)	28 (.16)	1,1	0.67 – 1.87	0.66		
	Controles	11 (.31)	17 (.47)	8 (.22)					
ApoE4 –	Casos	59 (.35)	79 (.47)	31 (.18)	1,1	0.80 – 1.45	0.62		
	Controles	61 (.33)	88 (.47)	37 (.20)					
Mujeres	Casos	82 (.33)	120 (.49)	43 (.18)	1	0.76 – 1.41	0.83		
	Controles	43 (.36)	50 (.42)	26 (.22)					
Varones	Casos	31 (.32)	51 (.52)	16 (.16)	1,1	0.76 – 1.6	0.56		
	Controles	23 (.28)	56 (.54)	19 (.18)					
Temprana	Casos	4 (.25)	10 (.63)	2 (.13)	0,8	0.36 – 1.92	0.66		
	Controles	14 (.38)	17 (.46)	6 (.16)					
Intermedia	Casos	100 (.32)	156 (.50)	57 (.18)	1,1	0.82 – 1.38	0.65		
	Controles	56 (.32)	84 (.47)	37 (.21)					
Tardía	Casos	8 (.62)	5 (.38)	0 (.00)	2,3	0.54 – 10.10	0.25		
	Controles	2 (.29)	5 (.71)	0 (.00)					

PLA2G3				España - Centro			A1 vs A2		
<a href="#">rs2232170</a>				A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p (χ²)
Todos	Casos	181 (.71)	66 (.26)	7 (.03)	1,3	0.95 – 1.74	0.1		
	Controles	231 (.65)	112 (.31)	13 (.04)					
ApoE4 +	Casos	88 (.70)	33 (.26)	5 (.04)	1,3	0.72 – 2.26	0.41		
	Controles	32 (.60)	20 (.38)	1 (.02)					
ApoE4 –	Casos	93 (.73)	33 (.26)	2 (.02)	1,4	0.94 – 2.10	0.1		
	Controles	199 (.66)	92 (.30)	12 (.04)					
Mujeres	Casos	112 (.70)	44 (.28)	4 (.03)	1,3	0.87 – 1.89	0.21		
	Controles	123 (.64)	63 (.33)	7 (.04)					
Varones	Casos	69 (.73)	22 (.23)	3 (.03)	1,2	0.71 – 1.98	0.52		
	Controles	91 (.69)	35 (.27)	5 (.04)					
Temprana	Casos	42 (.70)	18 (.30)	0 (.00)	1,8	0.99 – 3.25	0.05		
	Controles	57 (.56)	41 (.40)	4 (.04)					
Intermedia	Casos	120 (.74)	38 (.23)	5 (.03)	1,3	0.84 – 1.89	0.27		
	Controles	125 (.68)	54 (.29)	6 (.03)					
Tardía	Casos	13 (.62)	7 (.33)	1 (.05)	0,6	0.24 – 1.48	0.26		
	Controles	40 (.74)	13 (.24)	1 (.02)					

PLA2G3				España - Cataluña			A1 vs A2		
<a href="#">rs9619169</a>				A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p (χ²)
Todos	Casos	20 (.25)	47 (.59)	12 (.15)	1,5	1.04 – 2.27	0.04		
	Controles	23 (.19)	63 (.52)	36 (.30)					
ApoE4 +	Casos	5 (.36)	7 (.50)	2 (.14)	1,3	0.50 – 3.37	0.59		
	Controles	6 (.26)	13 (.57)	4 (.17)					
ApoE4 –	Casos	14 (.25)	33 (.59)	9 (.16)	1,6	1.01 – 2.61	0.04		
	Controles	17 (.18)	44 (.48)	31 (.31)					
Mujeres	Casos	16 (.32)	26 (.52)	8 (.16)	2,3	1.35 – 3.93	0.002		
	Controles	8 (.13)	32 (.50)	24 (.38)					
Varones	Casos	4 (.14)	21 (.72)	4 (.14)	0,9	0.48 – 1.69	0.75		
	Controles	15 (.26)	31 (.53)	12 (.21)					
Temprana	Casos	4 (.36)	4 (.36)	3 (.27)	1,6	0.52 – 4.75	0.42		
	Controles	2 (.13)	9 (.60)	4 (.27)					
Intermedia	Casos	9 (.22)	28 (.68)	4 (.10)	1,7	0.98 – 2.79	0.06		
	Controles	17 (.18)	48 (.51)	29 (.31)					
Tardía	Casos	0 (.00)	3 (.60)	2 (.40)	0,4	0.08 – 137	0.2		
	Controles	4 (.31)	6 (.46)	3 (.23)					

PLA2G3				España - Cataluña			A1 vs A2		
<a href="#">rs2232170</a>				A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p (χ²)
Todos	Casos	234 (.70)	94 (.28)	7 (.02)	1,3	0.94 – 1.77	0.12		
	Controles	132 (.64)	68 (.33)	7 (.03)					
ApoE4 +	Casos	112 (.67)	49 (.30)	5 (.03)	1,2	0.63 – 2.41	0.55		
	Controles	20 (.65)	9 (.29)	2 (.06)					
ApoE4 –	Casos	120 (.72)	45 (.27)	2 (.01)	1,4	0.94 – 2.10	0.1		
	Controles	112 (.64)	58 (.33)	5 (.03)					
Mujeres	Casos	167 (.70)	67 (.28)	5 (.02)	1,5	1.01 – 2.23	0.05		
	Controles	67 (.60)	40 (.36)	5 (.04)					
Varones	Casos	67 (.70)	27 (.28)	2 (.02)	1,1	0.61 – 1.81	0.85		
	Controles	65 (.68)	28 (.29)	2 (.02)					
Temprana	Casos	11 (.69)	5 (.31)	0 (.00)	1	0.33 – 3.30	0.94		
	Controles	23 (.68)	11 (.32)	0 (.00)					
Intermedia	Casos	210 (.69)	88 (.29)	7 (.02)	1,3	0.93 – 1.83	0.13		
	Controles	103 (.63)	54 (.33)	7 (.04)					
Tardía	Casos	12 (.92)	1 (.08)	0 (.00)	4,2	0.34 – 50.62	0.23		
	Controles	5 (.71)	2 (.29)	0 (.00)					

PLA2G3 <a href="#">rs2232170</a>	Canadá		A1 vs A2		p ( $\chi^2$ )
	A1	A2	OR	IC (95%)	
Todos	Casos 98 (.63)	10 (.06)	0,7	0,45 – 1,03	0,07
	Controlles 101 (.70)	3 (.02)			
ApoE4 +	Casos 20 (.59)	1 (.03)	0,9	0,36 – 2,30	0,84
	Controlles 14 (.64)	1 (.05)			
ApoE4 –	Casos 64 (.61)	8 (.08)	0,6	0,34 – 0,92	0,02
	Controlles 80 (.73)	2 (.02)			
Mujeres	Casos 48 (.59)	5 (.06)	0,6	0,36 – 1,11	0,11
	Controlles 51 (.70)	2 (.03)			
Varones	Casos 50 (.68)	5 (.07)	0,8	0,41 – 1,38	0,36
	Controlles 50 (.70)	1 (.01)			
Temprana	Casos 19 (.73)	1 (.04)	2	0,64 – 6,39	0,22
	Controlles 7 (.54)	1 (.08)			
Intermedia	Casos 39 (.63)	3 (.05)	0,7	0,38 – 1,16	0,15
	Controlles 39 (.63)	3 (.05)			
Tardía	Casos 4 (.67)	0 (.00)	0,8	0,13 – 5,30	0,85
	Controlles 10 (.71)	0 (.0)			

PLA2G3 <a href="#">rs2072193</a>	España - Centro		A1 vs A2		p ( $\chi^2$ )
	A1	A2	OR	IC (95%)	
Todos	Casos 0 (.00)	213 (.89)	1	0,61 – 1,72	0,92
	Controlles 1 (.00)	285 (.89)			
ApoE4 +	Casos 0 (.00)	104 (.89)	2,8	0,61–12,49	0,17
	Controlles 0 (.00)	46 (.96)			
ApoE4 –	Casos 0 (.00)	109 (.89)	0,9	0,49 – 1,77	0,83
	Controlles 1 (.00)	239 (.88)			
Mujeres	Casos 0 (.00)	136 (.89)	1	0,49 – 1,85	0,88
	Controlles 0 (.00)	169 (.89)			
Varones	Casos 0 (.00)	77 (.88)	1,4	0,58 – 3,15	0,48
	Controlles 0 (.00)	116 (.91)			
Temprana	Casos 0 (.00)	50 (.89)	0,8	0,28 – 2,39	0,72
	Controlles 0 (.00)	61 (.87)			
Intermedia	Casos 0 (.00)	137 (.87)	1,4	0,71 – 2,70	0,33
	Controlles 0 (.00)	165 (.91)			
Tardía	Casos 0 (.00)	21 (.100)	0	--	0,06
	Controlles 1 (.02)	45 (.87)			

PLA2G3 <a href="#">rs2074734</a>	España - Centro		A1 vs A2		p ( $\chi^2$ )
	A1	A2	OR	IC (95%)	
Todos	Casos 1 (.00)	219 (.91)	0,9	0,51 – 1,53	0,65
	Controlles 3 (.01)	289 (.91)			
ApoE4 +	Casos 1 (.01)	107 (.91)	0,6	0,24 – 1,67	0,35
	Controlles 1 (.02)	42 (.88)			
ApoE4 –	Casos 0 (.00)	112 (.91)	0,9	0,45 – 1,91	0,84
	Controlles 2 (.01)	247 (.91)			
Mujeres	Casos 1 (.01)	140 (.92)	0,9	0,43 – 1,86	0,77
	Controlles 1 (.01)	173 (.91)			
Varones	Casos 0 (.00)	79 (.90)	0,9	0,37 – 2,03	0,74
	Controlles 2 (.02)	115 (.90)			
Temprana	Casos 0 (.00)	50 (.89)	1,1	0,35 – 3,30	0,9
	Controlles 1 (.01)	64 (.91)			
Intermedia	Casos 1 (.01)	145 (.92)	0,8	0,38 – 1,61	0,51
	Controlles 1 (.01)	164 (.90)			
Tardía	Casos 0 (.00)	18 (.86)	1,9	0,41 – 8,99	0,4
	Controlles 0 (.00)	48 (.92)			

PLA2G3 <a href="#">rs2072193</a>	España - Centro		A1 vs A2		p ( $\chi^2$ )
	A1	A2	OR	IC (95%)	
Todos	Casos 0 (.00)	216 (.87)	1,1	0,65 – 1,72	0,83
	Controlles 0 (.00)	288 (.88)			
ApoE4 +	Casos 0 (.00)	106 (.88)	2,9	0,63–12,79	0,15
	Controlles 0 (.00)	45 (.96)			
ApoE4 –	Casos 0 (.00)	110 (.87)	1	0,56 – 1,84	0,96
	Controlles 0 (.00)	243 (.87)			
Mujeres	Casos 0 (.00)	138 (.87)	1,1	0,56 – 1,97	0,89
	Controlles 0 (.00)	152 (.88)			
Varones	Casos 0 (.00)	78 (.88)	1,2	0,51 – 2,68	0,71
	Controlles 0 (.00)	109 (.89)			
Temprana	Casos 0 (.00)	49 (.84)	1,1	0,45 – 2,56	0,88
	Controlles 0 (.00)	82 (.85)			
Intermedia	Casos 0 (.00)	137 (.87)	1,5	0,72 – 2,92	0,26
	Controlles 0 (.00)	148 (.91)			
Tardía	Casos 0 (.00)	21 (.100)	0	--	0,05
	Controlles 0 (.00)	45 (.83)			

PLA2G3 <a href="#">rs740231</a>	España - Centro			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%) p ( $\chi^2$ )
Todos	Casos 53 (.24)	119 (.54)	49 (.22)	1,2	0.90 – 1.50 0,25
	Controles 54 (.20)	141 (.53)	69 (.26)		
ApoE4 +	Casos 20 (.18)	63 (.57)	27 (.25)	1,1	0.64 – 1.78 0,79
	Controles 7 (.17)	23 (.56)	11 (.27)		
ApoE4 –	Casos 33 (.30)	56 (.50)	22 (.20)	1,4	0.97 – 1.86 0,07
	Controles 47 (.21)	118 (.53)	58 (.26)		
Mujeres	Casos 34 (.24)	75 (.52)	35 (.24)	1	0.75 – 1.43 0,82
	Controles 33 (.21)	90 (.56)	37 (.23)		
Varones	Casos 19 (.25)	44 (.57)	14 (.18)	1,4	0.91 – 2.10 0,13
	Controles 21 (.20)	51 (.50)	31 (.30)		
Temprana	Casos 11 (.22)	32 (.63)	8 (.16)	1,7	1.00 – 2.83 0,05
	Controles 9 (.14)	35 (.53)	22 (.33)		
Intermedia	Casos 33 (.22)	80 (.53)	37 (.25)	1	0.72 – 1.36 0,93
	Controles 33 (.22)	84 (.55)	36 (.24)		
Tardía	Casos 9 (.45)	7 (.35)	4 (.20)	1,6	0.75 – 3.42 0,23
	Controles 12 (.27)	22 (.49)	11 (.24)		
HMGCR <a href="#">rs3761740</a>	España - Centro			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%) p ( $\chi^2$ )
Todos	Casos 212 (.83)	41 (.16)	1 (.00)	1,1	0.74 – 1.65 0,63
	Controles 295 (.83)	56 (.16)	5 (.01)		
ApoE4 +	Casos 108 (.84)	20 (.16)	0 (.00)	1,8	0.87 – 3.70 0,11
	Controles 40 (.75)	12 (.23)	1 (.02)		
ApoE4 –	Casos 104 (.83)	21 (.17)	1 (.01)	0,9	0.56 – 1.56 0,8
	Controles 255 (.84)	44 (.15)	4 (.01)		
Mujeres	Casos 132 (.82)	28 (.17)	1 (.01)	1,3	0.77 – 2.06 0,35
	Controles 152 (.79)	36 (.19)	4 (.02)		
Varones	Casos 80 (.86)	13 (.14)	0 (.00)	1	0.47 – 2.06 0,96
	Controles 114 (.87)	16 (.12)	1 (.01)		
Temprana	Casos 48 (.81)	11 (.19)	0 (.00)	0,5	0.21 – 1.26 0,14
	Controles 89 (.90)	10 (.10)	0 (.00)		
Intermedia	Casos 137 (.84)	26 (.16)	1 (.01)	1,2	0.74 – 2.06 0,41
	Controles 153 (.81)	31 (.16)	47 (.02)		
Tardía	Casos 20 (.95)	1 (.05)	0 (.00)	6,6	0.85 – 51.8 0,04
	Controles 40 (.74)	13 (.24)	1 (.02)		
HMGCR <a href="#">rs5909</a>	España - Centro			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%) p ( $\chi^2$ )
Todos	Casos 207 (.83)	41 (.16)	1 (.00)	1,2	0.79 – 1.75 0,44
	Controles 283 (.82)	57 (.16)	6 (.02)		
ApoE4 +	Casos 103 (.84)	20 (.16)	0 (.00)	2	0.98 – 4.07 0,05
	Controles 36 (.72)	13 (.26)	1 (.02)		
ApoE4 –	Casos 104 (.83)	21 (.17)	1 (.01)	1	0.60 – 1.67 1
	Controles 247 (.83)	44 (.15)	4 (.02)		
Mujeres	Casos 129 (.82)	28 (.18)	1 (.01)	1,4	0.83 – 2.18 0,23
	Controles 148 (.78)	37 (.19)	5 (.03)		
Varones	Casos 78 (.86)	13 (.14)	0 (.00)	1	0.48 – 2.11 0,98
	Controles 108 (.86)	16 (.13)	1 (.01)		
Temprana	Casos 48 (.81)	11 (.19)	0 (.00)	0,8	0.34 – 1.75 0,52
	Controles 83 (.86)	12 (.13)	1 (.01)		
Intermedia	Casos 133 (.83)	26 (.16)	1 (.01)	1,2	0.75 – 2.07 0,4
	Controles 148 (.81)	31 (.17)	4 (.02)		
Tardía	Casos 20 (.95)	1 (.05)	0 (.00)	6,4	0.81 – 50.15 0,05
	Controles 39 (.75)	12 (.23)	1 (.02)		

HMGCR <a href="#">rs5909</a>	España - Cataluña			A1 vs A2		
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p ( $\chi^2$ )
Todos	Casos 283 (.84) Controles 168 (.76)	54 (.16) 47 (.21)	1 (.00) 4 (.02)	1,6	1.07 – 2.36	0,02
ApoE4 +	Casos 143 (.84) Controles 28 (.78)	27 (.16) 8 (.22)	1 (.01) 0 (.00)	1,4	0.59 – 3.09	0,48
ApoE4 –	Casos 139 (.84) Controles 139 (.76)	27 (.16) 39 (.21)	0 (.00) 4 (.02)	1,7	1.02 – 2.76	0,04
Mujeres	Casos 210 (.87) Controles 88 (.75)	32 (.13) 27 (.23)	0 (.00) 3 (.03)	2,3	1.37 – 3.84	0,001
Varones	Casos 73 (.76) Controles 80 (.79)	22 (.23) 20 (.20)	1 (.01) 1 (.01)	0,9	0.46 – 1.58	0,62
Temprana	Casos 13 (.81) Controles 28 (.76)	3 (.19) 9 (.24)	0 (.00) 0 (.00)	1,3	0.34 – 5.31	0,68
Intermedia	Casos 259 (.84) Controles 134 (.77)	48 (.16) 35 (.20)	1 (.00) 4 (.02)	1,6	1.04 – 2.47	0,03
Tardía	Casos 10 (.77) Controles 4 (.57)	3 (.23) 3 (.43)	0 (.00) 0 (.00)	2,1	0.36 – 12.08	0,4

GENES INDUCIDOS POR ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO						
DDIT3 <a href="#">rs3847699</a>	España - Centro			A1 vs A2		
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p ( $\chi^2$ )
Todos	Casos 177 (.69) Controles 267 (.74)	71 (.28) 86 (.24)	9 (.04) 9 (.02)	0,8	0.59 – 1.09	0,16
ApoE4 +	Casos 88 (.69) Controles 37 (.69)	34 (.27) 14 (.26)	6 (.05) 3 (.06)	1	0.58 – 1.72	0,90
ApoE4 –	Casos 89 (.69) Controles 230 (.75)	37 (.29) 72 (.23)	3 (.02) 6 (.02)	0,8	0.53 – 1.18	0,25
Mujeres	Casos 112 (.69) Controles 146 (.74)	44 (.27) 46 (.23)	6 (.04) 5 (.03)	0,8	0.53 – 1.19	0,26
Varones	Casos 65 (.68) Controles 97 (.73)	27 (.28) 33 (.25)	3 (.03) 2 (.02)	0,8	0.46 – 1.29	0,33
Temprana	Casos 40 (.66) Controles 77 (.75)	20 (.33) 23 (.22)	1 (.02) 3 (.03)	0,7	0.41 – 1.37	0,34
Intermedia	Casos 116 (.70) Controles 138 (.73)	41 (.25) 47 (.25)	8 (.05) 4 (.02)	0,8	0.54 – 1.22	0,32
Tardía	Casos 11 (.52) Controles 42 (.76)	10 (.48) 12 (.22)	0 (.00) 1 (.02)	0,5	0.19 – 1.15	0,09

HMGCR <a href="#">rs5909</a>	Canadá			A1 vs A2		
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p ( $\chi^2$ )
Todos	Casos 132 (.87) Controles 110 (.80)	18 (.12) 27 (.20)	2 (.01) 0 (.00)	1,4	0.78 – 2.52	0,26
ApoE4 +	Casos 33 (.89) Controles 18 (.86)	4 (.11) 3 (.14)	0 (.00) 0 (.00)	1,4	0.29 – 6.33	0,71
ApoE4 –	Casos 81 (.84) Controles 82 (.79)	14 (.15) 2 (.21)	1 (.01) 0 (.00)	1,3	0.66 – 2.56	0,44
Mujeres	Casos 76 (.87) Controles 57 (.85)	10 (.11) 10 (.15)	1 (.01) 0 (.00)	1,1	0.46 – 2.60	0,85
Varones	Casos 56 (.86) Controles 53 (.76)	8 (.12) 17 (.24)	1 (.02) 0 (.00)	1,7	0.73 – 3.77	0,22
Temprana	Casos 20 (.87) Controles 9 (.64)	3 (.13) 5 (.36)	0 (.00) 0 (.00)	3,1	0.68 – 14.22	0,13
Intermedia	Casos 59 (.92) Controles 87 (.81)	5 (.08) 20 (.19)	0 (.00) 0 (.00)	2,5	0.93 – 6.93	0,06
Tardía	Casos 4 (.80) Controles 14 (.88)	1 (.20) 2 (.13)	0 (.00) 0 (.00)	0,6	0.05 – 7.41	0,69

GENES INDUCIDOS POR ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO						
DDIT3 <a href="#">rs3847699</a>	España - Cataluña			A1 vs A2		
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p ( $\chi^2$ )
Todos	Casos 239 (.70) Controles 135 (.61)	96 (.28) 84 (.38)	7 (.02) 4 (.02)	1,4	1.00 – 1.84	0,05
ApoE4 +	Casos 113 (.66) Controles 21 (.58)	55 (.32) 15 (.42)	4 (.02) 0 (.00)	1,2	0.62 – 2.21	0,62
ApoE4 –	Casos 125 (.74) Controles 113 (.61)	41 (.24) 69 (.37)	3 (.02) 4 (.02)	1,6	1.09 – 2.40	0,02
Mujeres	Casos 173 (.71) Controles 66 (.55)	69 (.28) 50 (.42)	2 (.01) 3 (.03)	1,8	1.19 – 2.58	0,005
Varones	Casos 66 (.67) Controles 69 (.66)	27 (.28) 34 (.33)	5 (.05) 1 (.01)	0,9	0.54 – 1.49	0,68
Temprana	Casos 14 (.88) Controles 18 (.49)	2 (.13) 16 (.43)	0 (.00) 3 (.08)	6,4	1.39 – 28.89	0,008
Intermedia	Casos 215 (.69) Controles 111 (.63)	90 (.29) 65 (.37)	7 (.02) 1 (.01)	1,2	0.83 – 1.64	0,37
Tardía	Casos 10 (.77) Controles 5 (.71)	3 (.23) 2 (.29)	0 (.00) 0 (.00))	1,3	0.19 – 8.72	0,8

DNAIB9 <a href="#">rs22727272</a>	España - Centro			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%) p ( $\chi^2$ )
Todos	Casos 140 (.66)	68 (.32)	4 (.02)	1,1	0.82 – 1.54 0,48
	Controles 208 (.64)	103 (.32)	12 (.04)		
ApoE4 +	Casos 70 (.67)	31 (.30)	3 (.03)	1,5	0.80 – 2.64 0,22
	Controles 28 (.61)	14 (.30)	4 (.09)		
ApoE4 –	Casos 70 (.65)	37 (.34)	1 (.01)	1,1	0.71 – 1.59 0,77
	Controles 180 (.65)	89 (.32)	8 (.03)		
Mujeres	Casos 91 (.69)	38 (.29)	3 (.02)	1,2	0.76 – 1.78 0,48
	Controles 16 (.67)	47 (.27)	9 (.05)		
Varones	Casos 49 (.61)	30 (.38)	1 (.01)	1,1	0.67 – 1.80 0,71
	Controles 73 (.59)	47 (.38)	3 (.02)		
Temprana	Casos <b>35 (.78)</b>	<b>10 (.22)</b>	<b>0 (.00)</b>	<b>2,3</b>	<b>1.10 – 4.89 0,02</b>
	Controles <b>54 (.61)</b>	<b>30 (.34)</b>	<b>5 (.06)</b>		
Intermedia	Casos 88 (.64)	48 (.35)	2 (.01)	0,8	0.54 – 1.25 0,35
	Controles 116 (.70)	47 (.28)	3 (.02)		
Tardía	Casos 11 (.58)	7 (.37)	1 (.05)	1,1	0.48 – 2.67 0,78
	Controles <b>30 (.56)</b>	<b>20 (.367)</b>	<b>4 (.07)</b>		
EIF2AK3 <a href="#">rs1805164</a>	España - Centro			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%) p ( $\chi^2$ )
Todos	Casos 24 (.10)	96 (.38)	132 (.52)	1,1	0.84 – 1.40 0,51
	Controles 30 (.08)	133 (.37)	196 (.55)		
ApoE4 +	Casos 11 (.09)	46 (.37)	69 (.55)	1,2	0.71 – 2.03 0,5
	Controles 2 (.04)	21 (.40)	30 (.57)		
ApoE4 –	Casos 13 (.10)	50 (.40)	63 (.50)	1,1	0.86 – 1.58 0,42
	Controles 28 (.09)	112 (.37)	166 (.54)		
Mujeres	Casos 16 (.10)	62 (.39)	80 (.51)	1,2	0.87 – 1.69 0,26
	Controles 14 (.07)	73 (.37)	108 (.55)		
Varones	Casos 8 (.09)	34 (.36)	52 (.55)	0,9	0.59 – 1.37 0,64
	Controles 14 (.11)	47 (.36)	70 (.53)		
Temprana	Casos 4 (.07)	29 (.48)	28 (.46)	1,4	0.82 – 2.24 0,23
	Controles 6 (.06)	38 (.37)	59 (.57)		
Intermedia	Casos 18 (.11)	57 (.36)	85 (.53)	1	0.70 – 1.36 0,88
	Controles 18 (.10)	74 (.40)	94 (.51)		
Tardía	Casos 1 (.05)	6 (.29)	14 (.67)	0,8	0.33 – 1.95 0,62
	Controles 4 (.07)	17 (.31)	34 (.62)		
EIF2AK3 <a href="#">rs1805165</a>	España - Centro			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%) p ( $\chi^2$ )
Todos	Casos 139 (.55)	103 (.40)	13 (.05)	1,1	0.84 – 1.41 0,52
	Controles 185 (.51)	159 (.4)	18 (.05)		
ApoE4 +	Casos 62 (.50)	55 (.44)	8 (.06)	1,2	0.75 – 1.99 0,42
	Controles 26 (.48)	21 (.39)	7 (.13)		
ApoE4 –	Casos 76 (.59)	48 (.37)	5 (.04)	1,2	0.86 – 1.71 0,28
	Controles 159 (.52)	138 (.45)	11 (.04)		
Mujeres	Casos 91 (.56)	65 (.40)	6 (.04)	1,3	0.91 – 1.78 0,16
	Controles 93 (.47)	96 (.49)	8 (.04)		
Varones	Casos 48 (.52)	38 (.41)	7 (.08)	0,9	0.57 – 1.34 0,54
	Controles 71 (.54)	55 (.42)	6 (.05)		
Temprana	Casos 33 (.54)	24 (.39)	4 (.07)	1,2	0.72 – 1.96 0,51
	Controles 49 (.48)	47 (.46)	7 (.07)		
Intermedia	Casos 91 (.56)	63 (.39)	9 (.06)	1	0.72 – 1.43 0,93
	Controles 102 (.54)	79 (.42)	8 (.04)		
Tardía	Casos 10 (.48)	11 (.52)	0 (.00)	0,8	0.37 – 1.88 0,65
	Controles 31 (.56)	23 (.42)	1 (.02)		
DNAIB9 <a href="#">rs22727272</a>	España - Cataluña			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%) p ( $\chi^2$ )
Todos	Casos 27 (.08)	138 (.40)	177 (.52)	1	0.74 – 1.25 0,76
	Controles 22 (.140)	85 (.38)	116 (.52)		
ApoE4 +	Casos 11 (.06)	65 (.38)	96 (.56)	0,9	0.53 – 1.68 0,85
	Controles 3 (.08)	13 (.36)	20 (.56)		
ApoE4 –	Casos 16 (.09)	73 (.43)	80 (.47)	1,1	0.79 – 1.50 0,61
	Controles 19 (.10)	71 (.38)	96 (.52)		
Mujeres	Casos 19 (.08)	109 (.45)	116 (.48)	1	0.71 – 1.39 0,97
	Controles 13 (.11)	46 (.39)	60 (.50)		
Varones	Casos 8 (.08)	29 (.30)	61 (.62)	0,8	0.50 – 1.24 0,3
	Controles 9 (.09)	39 (.38)	56 (.54)		
Temprana	Casos 1 (.06)	4 (.25)	11 (.69)	0,6	0.22 – 1.74 0,36
	Controles 4 (.11)	12 (.32)	21 (.57)		
Intermedia	Casos 26 (.08)	126 (.40)	160 (.51)	1	0.73 – 1.30 0,85
	Controles 17 (.310)	69 (.39)	91 (.51)		
Tardía	Casos 0 (.0)	7 (.54)	6 (.46)	0,5	0.13 – 1.93 0,3
	Controles 1 (.14)	4 (.57)	2 (.29)		



HSPA5 <a href="#">rs17840761</a>	España - Centro			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)
Todos	Casos 50 (.19)	145 (.56)	63 (.24)	0,9	0,75 – 1,17
	Controles 87 (.24)	182 (.50)	93 (.26)		
ApoE4 +	Casos 29 (.23)	72 (.56)	27 (.21)	0,9	0,55 – 1,35
	Controles 15 (.28)	29 (.54)	10 (.19)		
ApoE4 –	Casos 21 (.16)	73 (.56)	36 (.28)	0,9	0,64 – 1,14
	Controles 72 (.23)	153 (.50)	83 (.27)		
Mujeres	Casos 30 (.18)	95 (.58)	38 (.23)	0,9	0,69 – 1,24
	Controles 49 (.25)	97 (.49)	51 (.26)		
Varones	Casos 20 (.21)	50 (.53)	25 (.26)	1	0,69 – 1,45
	Controles 30 (.23)	65 (.49)	37 (.28)		
Temprana	Casos 11 (.18)	33 (.54)	17 (.28)	0,7	0,14 – 1,15
	Controles 27 (.26)	55 (.53)	21 (.20)		
Intermedia	Casos 33 (.20)	95 (.57)	38 (.23)	1	0,75 – 1,36
	Controles 43 (.23)	96 (.51)	50 (.26)		
Tardía	Casos 5 (.24)	11 (.52)	5 (.24)	1,2	0,61 – 2,54
	Controles 12 (.22)	25 (.45)	18 (.33)		
HSPA5 <a href="#">rs391957</a>	España - Centro			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)
Todos	Casos 37 (.14)	131 (.51)	89 (.35)	0,9	0,74 – 1,17
	Controles 60 (.17)	181 (.50)	121 (.33)		
ApoE4 +	Casos 21 (.16)	65 (.51)	42 (.33)	0,8	0,49 – 1,22
	Controles 11 (.20)	30 (.56)	13 (.24)		
ApoE4 –	Casos 16 (.12)	66 (.51)	47 (.36)	0,9	0,69 – 1,22
	Controles 49 (.16)	151 (.49)	108 (.35)		
Mujeres	Casos 22 (.14)	86 (.53)	54 (.33)	0,9	0,69 – 1,25
	Controles 35 (.18)	95 (.48)	67 (.34)		
Varones	Casos 15 (.16)	45 (.47)	35 (.37)	1	0,65 – 1,40
	Controles 22 (.17)	63 (.48)	47 (.36)		
Temprana	Casos 9 (.15)	33 (.54)	19 (.31)	0,9	0,56 – 1,37
	Controles 15 (.15)	63 (.61)	25 (.24)		
Intermedia	Casos 25 (.15)	81 (.349)	59 (.36)	0,9	0,69 – 1,27
	Controles 35 (.19)	86 (.46)	68 (.36)		
Tardía	Casos 3 (.14)	10 (.48)	8 (.38)	1,1	0,52 – 2,24
	Controles 7 (.13)	26 (.47)	22 (.40)		

HSPA5 <a href="#">rs17840761</a>	España - Cataluña			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)
Todos	Casos 78 (.23)	164 (.48)	101 (.29)	1	0,79 – 1,27
	Controles 57 (.26)	93 (.42)	72 (.32)		
ApoE4 +	Casos 39 (.23)	75 (.44)	58 (.34)	0,8	0,48 – 1,36
	Controles 11 (.32)	13 (.37)	11 (.31)		
ApoE4 –	Casos 38 (.22)	88 (.52)	43 (.25)	1,1	0,82 – 1,49
	Controles 46 (.25)	79 (.42)	61 (.33)		
Mujeres	Casos 56 (.23)	121 (.49)	68 (.28)	1,2	0,84 – 1,57
	Controles 24 (.20)	57 (.48)	38 (.32)		
Varones	Casos 22 (.22)	43 (.44)	33 (.34)	0,8	0,55 – 1,20
	Controles 33 (.32)	36 (.35)	34 (.33)		
Temprana	Casos 5 (.31)	11 (.69)	0 (.00)	2,3	0,95 – 5,31
	Controles 8 (.22)	18 (.49)	11 (.30)		
Intermedia	Casos 70 (.22)	145 (.46)	98 (.31)	0,9	0,72 – 1,22
	Controles 47 (.27)	72 (.41)	57 (.32)		
Tardía	Casos 2 (.15)	8 (.62)	3 (.23)	1,5	0,40 – 5,88
	Controles 2 (.29)	1 (.14)	4 (.57)		
HYOU1 <a href="#">rs13929</a>	España - Centro			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)
Todos	Casos 72 (.29)	128 (.51)	50 (.20)	0,9	0,70 – 1,12
	Controles 113 (.33)	170 (.49)	62 (.18)		
ApoE4 +	Casos 33 (.26)	68 (.54)	24 (.19)	0,7	0,45 – 1,15
	Controles 19 (.37)	26 (.50)	7 (.13)		
ApoE4 –	Casos 39 (.31)	60 (.48)	26 (.21)	0,9	0,70 – 1,27
	Controles 94 (.32)	144 (.49)	55 (.19)		
Mujeres	Casos 46 (.29)	77 (.49)	34 (.22)	0,8	0,56 – 1,03
	Controles 67 (.35)	96 (.51)	27 (.14)		
Varones	Casos 26 (.28)	51 (.55)	16 (.17)	1,1	0,74 – 1,60
	Controles 37 (.30)	56 (.46)	29 (.24)		
Temprana	Casos 14 (.23)	33 (.55)	13 (.22)	0,9	0,58 – 1,44
	Controles 28 (.28)	50 (8,50)	22 (.22)		
Intermedia	Casos 49 (.31)	80 (.50)	30 (.19)	0,9	0,63 – 1,16
	Controles 68 (.368)	77 (.43)	33 (.19)		
Tardía	Casos 8 (.38)	8 (.38)	5 (.24)	1	0,48 – 2,03
	Controles 14 (.26)	33 (.62)	6 (.11)		

HYOU1 <a href="#">rs1003081</a>	España - Centro			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%) p (χ²)
Todos	Casos 44 (.25)	88 (.50)	43 (.25)	1,3	0,95 – 1,66 0,11
	Controles 43 (.19)	121 (.52)	68 (.29)		
ApoE4 +	Casos 22 (.23)	53 (.55)	22 (.23)	1,4	0,81 – 2,35 0,24
	Controles 6 (.16)	20 (.53)	12 (.32)		
ApoE4 –	Casos 22 (.28)	35 (.45)	21 (.27)	1,3	0,86 – 1,81 0,24
	Controles 37 (.19)	101 (.529)	56 (.29)		
Mujeres	Casos <b>29 (.28)</b>	<b>50 (.49)</b>	<b>24 (.23)</b>	<b>1,6</b>	<b>1,09 – 2,29 0,01</b>
	Controles <b>20 (.16)</b>	<b>66 (.51)</b>	<b>43 (.33)</b>		
Varones	Casos 15 (.21)	38 (.53)	19 (.26)	1	0,62 – 1,48 0,84
	Controles 21 (.23)	46 (.51)	24 (.26)		
Temprana	Casos 12 (.30)	18 (.45)	10 (.25)	1,2	0,67 – 2,05 0,57
	Controles 14 (.22)	35 (.54)	16 (.25)		
Intermedia	Casos 26 (.23)	60 (.53)	27 (.24)	1,3	0,93 – 1,94 0,11
	Controles 24 (.20)	55 (.45)	43 (.35)		
Tardía	Casos 5 (.36)	4 (.29)	5 (.36)	1,1	0,45 – 2,80 0,77
	Controles 4 (.13)	20 (.67)	6 (.20)		

GENES RELACIONADOS CON LA RESPUESTA INTEGRADA A ESTRÉS

MAP1LC3B <a href="#">rs11117269</a>	España - Centro			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%) p (χ²)
Todos	Casos 59 (.25)	98 (.41)	82 (.34)	0,9	0,67 – 1,07 0,17
	Controles 83 (.24)	181 (.51)	88 (.25)		
ApoE4 +	Casos 25 (.21)	52 (.44)	41 (.35)	0,9	0,56 – 1,40 0,6
	Controles 11 (.21)	27 (.51)	15 (.28)		
ApoE4 –	Casos 34 (.28)	46 (.38)	41 (.34)	0,9	0,66 – 1,21 0,47
	Controles 72 (.24)	154 (.52)	73 (.24)		
Mujeres	Casos 37 (.24)	59 (.39)	56 (.37)	0,8	0,59 – 1,07 0,13
	Controles 46 (.24)	99 (.51)	48 (.25)		
Varones	Casos 22 (.25)	39 (.45)	26 (.30)	0,9	0,63 – 1,36 0,7
	Controles 28 (.22)	70 (.55)	29 (.23)		
Temprana	Casos 20 (.35)	19 (.33)	18 (.32)	1,1	0,72 – 1,80 0,58
	Controles 27 (.26)	45 (.44)	30 (.29)		
Intermedia	Casos <b>32 (.21)</b>	<b>63 (.42)</b>	<b>56 (.37)</b>	<b>0,7</b>	<b>0,55 – 1,01 0,06</b>
	Controles <b>43 (.24)</b>	<b>93 (.51)</b>	<b>45 (.25)</b>		
Tardía	Casos 4 (.19)	9 (.43)	8 (.38)	0,6	0,30 – 1,25 0,18
	Controles 10 (.19)	37 (.69)	7 (.13)		

MAP1LC3B <a href="#">rs11117269</a>	España - Cataluña			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%) p (χ²)
Todos	Casos 64 (.19)	164 (.48)	114 (.33)	0,9	0,68 – 1,10 0,25
	Controles 45 (.20)	116 (.52)	62 (.28)		
ApoE4 +	Casos 27 (.16)	86 (.50)	58 (.34)	0,9	0,55 – 1,53 0,74
	Controles 7 (.19)	17 (.47)	12 (.33)		
ApoE4 –	Casos 36 (.21)	77 (.46)	56 (.33)	0,9	0,67 – 1,21 0,47
	Controles 38 (.20)	98 (.53)	50 (.27)		
Mujeres	Casos 46 (.19)	114 (.47)	84 (.34)	0,9	0,62 – 1,16 0,31
	Controles 24 (.20)	62 (.52)	33 (.28)		
Varones	Casos 18 (.18)	50 (.51)	30 (.31)	0,9	0,62 – 1,35 0,65
	Controles 21 (.20)	54 (.52)	29 (.28)		
Temprana	Casos 5 (.31)	6 (.38)	5 (.31)	1,1	0,49 – 2,55 0,8
	Controles 7 (.19)	21 (.57)	9 (.24)		
Intermedia	Casos 56 (.18)	149 (.48)	107 (.34)	0,9	0,68 – 1,15 0,35
	Controles 33 (.19)	93 (.53)	51 (.29)		
Tardía	Casos 3 (.23)	8 (.62)	2 (.15)	0,7	0,17 – 2,47 0,52
	Controles 4 (.57)	1 (.14)	2 (.29)		

MAP1LC3B <a href="#">rs9903</a>	España - Centro			A1 vs A2		
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p ( $\chi^2$ )
Todos	Casos 185 (.76) Controles 276 (.80)	54 (.22) 63 (.18)	5 (.02) 5 (.01)	0,8	0,55 – 1,12	0,19
ApoE4 +	Casos 89 (.875) Controles 34 (.72)	26 (.22) 13 (.28)	3 (.03) 0 (.00)	1	0,51 – 2,05	0,95
ApoE4 –	Casos 96 (.76) Controles 242 (.81)	28 (.22) 50 (.17)	2 (.02) 5 (.02)	0,8	0,46 – 1,22	0,27
Mujeres	Casos 120 (.77) Controles 153 (.81)	31 (.20) 33 (.18)	4 (.03) 2 (.01)	0,8	0,47 – 1,22	0,26
Varones	Casos 65 (.73) Controles 99 (.79)	23 (.26) 25 (.20)	1 (.01) 2 (.02)	0,8	0,45 – 1,41	0,43
Temprana	Casos 43 (.77) Controles 80 (.82)	12 (.21) 17 (.17)	1 (.02) 1 (.01)	0,8	0,36 – 1,56	0,44
Intermedia	Casos 121 (.77) Controles 142 (.81)	33 (.21) 31 (.18)	4 (.03) 3 (.02)	0,8	0,49 – 1,26	0,32
Tardía	Casos 12 (.60) Controles 41 (.75)	8 (.40) 14 (.25)	0 (.00) 0 (.00)	0,5	0,22 – 1,52	0,27

GENES INDUCIDOS POR ESTRÉS ADRENÉRGICO						
ARID4A <a href="#">rs1051858</a>	España - Centro			A1 vs A2		
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p ( $\chi^2$ )
Todos	Casos 25 (.10) Controles 30 (.08)	85 (.34) 134 (.38)	143 (.57) 189 (.54)	1	0,74 – 1,24	0,76
ApoE4 +	Casos 12 (.10) Controles 3 (.06)	39 (.31) 23 (.44)	74 (.59) 26 (.50)	0,9	0,52 – 1,46	0,6
ApoE4 –	Casos 13 (.10) Controles 27 (.09)	46 (.36) 111 (.37)	69 (.54) 163 (.54)	1	0,75 – 1,44	0,83
Mujeres	Casos 18 (.11) Controles 20 (.10)	54 (.34) 72 (.38)	87 (.55) 100 (.52)	1	0,69 – 1,33	0,8
Varones	Casos 7 (.07) Controles 9 (.07)	31 (.33) 47 (.37)	56 (.60) 72 (.56)	0,9	0,60 – 1,43	0,73
Temprana	Casos 5 (.08) Controles 4 (.04)	22 (.36) 34 (.34)	34 (.56) 62 (.62)	1,3	0,79 – 2,27	0,28
Intermedia	Casos 18 (.11) Controles 19 (.10)	54 (.34) 69 (.38)	89 (.55) 96 (.52)	1	0,68 – 1,32	0,74
Tardía	Casos 1 (.05) Controles 7 (.13)	6 (.29) 23 (.43)	14 (.67) 24 (.44)	0,5	0,19 – 1,07	0,07

PP1CA <a href="#">rs7480390</a>	España - Centro			A1 vs A2		
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p ( $\chi^2$ )
Todos	Casos 213 (.85) Controles 299 (.84)	37 (.15) 54 (.15)	2 (.01) 2 (.01)	1	0,66 – 1,52	0,98
ApoE4 +	Casos 110 (.87) Controles 48 (.78)	14 (.11) 12 (.22)	2 (.02) 0 (.00)	1,6	0,75 – 3,50	0,21
ApoE4 –	Casos 103 (.82) Controles 257 (.85)	23 (.18) 42 (.14)	0 (.00) 2 (.01)	0,8	0,49 – 1,39	0,47
Mujeres	Casos 133 (.84) Controles 162 (.84)	24 (.15) 31 (.16)	1 (.01) 1 (.01)	1	0,61 – 1,77	0,89
Varones	Casos 80 (.85) Controles 112 (.88)	13 (.14) 16 (.16)	1 (.01) 0 (.0)	0,8	0,37 – 1,60	0,48
Temprana	Casos 51 (.84) Controles 84 (.82)	9 (.15) 17 (.17)	1 (.02) 2 (.02)	1,2	0,53 – 2,47	0,73
Intermedia	Casos 134 (.84) Controles 158 (.86)	24 (.15) 25 (.14)	1 (.01) 0 (.00)	0,8	0,47 – 1,47	0,52
Tardía	Casos 17 (.81) Controles 47 (.87)	4 (.19) 7 (.13)	0 (.00) 0 (.00)	0,7	0,18 – 2,38	0,52

CAPN9 <a href="#">rs3895368</a>	España - Centro			A1 vs A2		
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p ( $\chi^2$ )
Todos	Casos 203 (.80) Controles 281 (.78)	49 (.19) 74 (.21)	2 (.01) 3 (.01)	1,1	0,75 – 1,59	0,68
ApoE4 +	Casos 103 (.81) Controles 41 (.76)	23 (.18) 12 (.22)	1 (.01) 1 (.02)	1,4	0,68 – 2,74	0,38
ApoE4 –	Casos 100 (.79) Controles 240 (.79)	26 (.20) 62 (.20)	1 (.01) 2 (.01)	1	0,62 – 1,57	0,94
Mujeres	Casos 134 (.83) Controles 151 (.78)	26 (.16) 41 (.21)	1 (.01) 2 (.01)	1,4	0,84 – 2,26	0,2
Varones	Casos 69 (.74) Controles 104 (.79)	23 (.25) 26 (.20)	1 (.01) 1 (.01)	0,8	0,43 – 1,37	0,37
Temprana	Casos 48 (.80) Controles 79 (.77)	12 (.20) 23 (.22)	0 (.00) 1 (.01)	1,2	0,60 – 2,58	0,56
Intermedia	Casos 132 (.80) Controles 149 (.80)	30 (.18) 35 (.19)	2 (.01) 2 (.01)	1	0,62 – 1,65	0,96
Tardía	Casos 16 (.80) Controles 41 (.76)	4 (.20) 13 (.24)	0 (.00) 0 (.00)	1,2	0,38 – 4,03	0,73



CAPN9			España - Centro			A1 vs A2		
rs1933631			A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p (χ²)
Todos	Casos	28 (.11)	108 (.44)	111 (.45)	1	0.77 – 1.25	0.88	
	Controles	45 (.13)	144 (.41)	159 (.46)				
ApoE4 +	Casos	13 (.11)	54 (.44)	56 (.46)	1,1	0.68 – 1.82	0,67	
	Controles	7 (.13)	18 (.34)	28 (.53)				
ApoE4 –	Casos	15 (.12)	54 (.44)	55 (.44)	1	0.72 – 1.35	0,92	
	Controles	38 (.13)	126 (.43)	131 (.44)				
Mujeres	Casos	17 (.11)	71 (.46)	68 (.44)	1	0.70 – 1.32	0,82	
	Controles	18 (.09)	97 (.50)	78 (.40)				
Varones	Casos	11 (.12)	37 (.41)	43 (.47)	0,9	0.61 – 1.37	0,66	
	Controles	22 (.18)	40 (.33)	60 (.49)				
Temprana	Casos	5 (.08)	22 (.36)	34 (.56)	0,7	0.44 – 1.20	0,21	
	Controles	13 (.13)	39 (.39)	47 (.47)				
Intermedia	Casos	22 (.14)	71 (.45)	65 (.41)	1,1	0.83 – 1.57	0,4	
	Controles	22 (.12)	76 (.42)	82 (.46)				
Tardía	Casos	1 (.05)	12 (.60)	7 (.35)	0,9	0.41 – 1.88	0,74	
	Controles	8 (.15)	25 (.46)	21 (.39)				

DSC1			España - Cataluña			A1 vs A2		
rs1789072			A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p (χ²)
Todos	Casos	233 (.68)	93 (.27)	15 (.04)	1,2	0.90 – 1.64	0,21	
	Controles	139 (.62)	74 (.33)	10 (.04)				
ApoE4 +	Casos	112 (.65)	50 (.29)	9 (.05)	1,1	0.57 – 1.99	0,85	
	Controles	22 (.61)	13 (.36)	1 (.03)				
ApoE4 –	Casos	120 (.71)	43 (.25)	6 (.04)	1,4	0.95 – 2.03	0,09	
	Controles	116 (.62)	61 (.33)	9 (.05)				
Mujeres	Casos	161 (.66)	71 (.29)	12 (.05)	1	0.65 – 1.43	0,86	
	Controles	78 (.66)	37 (.31)	4 (.03)				
Varones	Casos	72 (.74)	22 (.23)	3 (.03)	1,8	1.09 – 3.05	0,02	
	Controles	61 (.59)	37 (.36)	6 (.06)				
Temprana	Casos	13 (.81)	2 (.13)	1 (.06)	1,2	0.36 – 4.17	0,75	
	Controles	26 (.70)	11 (.30)	0 (.00)				
Intermedia	Casos	213 (.68)	85 (.27)	13 (.04)	1,3	0.94 – 1.80	0,11	
	Controles	108 (.61)	60 (.34)	9 (.05)				
Tardía	Casos	6 (.46)	6 (.46)	1 (.08)	1,3	0.32 – 4.94	0,75	
	Controles	3 (.43)	3 (.43)	1 (.14)				

DSC1			España - Centro			A1 vs A2		
rs1789072			A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p (χ²)
Todos	Casos	177 (.71)	63 (.25)	11 (.04)	1,1	0.82 – 1.50	0,49	
	Controles	239 (.66)	113 (.31)	10 (.03)				
ApoE4 +	Casos	83 (.67)	33 (.27)	8 (.06)	0,7	0.38 – 1.31	0,27	
	Controles	38 (.70)	16 (.30)	0 (.00)				
ApoE4 –	Casos	94 (.74)	30 (.24)	3 (.02)	1,4	0.95 – 2.15	0,08	
	Controles	199 (.65)	97 (.32)	10 (.03)				
Mujeres	Casos	103 (.65)	45 (.28)	10 (.06)	0,9	0.59 – 1.24	0,44	
	Controles	131 (.66)	60 (.30)	6 (.03)				
Varones	Casos	74 (.80)	18 (.19)	1 (.01)	2,3	1.31 – 3.95	0,003	
	Controles	78 (.60)	48 (.37)	4 (.03)				
Temprana	Casos	41 (.69)	16 (.27)	2 (.03)	1	0.57 – 1.89	0,9	
	Controles	68 (.66)	34 (.33)	1 (.01)				
Intermedia	Casos	112 (0.70)	42 (0.26)	7 (.04)	1,1	0.75 – 1.63	0,61	
	Controles	124 (.66)	57 (.30)	7 (.04)				
Tardía	Casos	16 (.76)	4 (.19)	1 (.05)	1,6	0.61 – 4.32	0,33	
	Controles	33 (.71)	19 (.35)	2 (.04)				

IFT74			España - Centro			A1 vs A2		
rs3429			A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p (χ²)
Todos	Casos	5 (.02)	48 (.20)	193 (.78)	1,1	0.74 – 1.52	0,74	
	Controles	4 (.01)	70 (.20)	275 (.79)				
ApoE4 +	Casos	2 (.02)	24 (.19)	99 (.79)	0,9	0.45 – 1.82	0,77	
	Controles	1 (.02)	11 (.21)	41 (.77)				
ApoE4 –	Casos	3 (.02)	24 (.20)	94 (.78)	1,2	0.72 – 1.82	0,56	
	Controles	3 (.01)	59 (.20)	234 (.79)				
Mujeres	Casos	3 (.02)	30 (.19)	121 (.79)	1	0.65 – 1.67	0,86	
	Controles	28 (.01)	39 (.20)	150 (.79)				
Varones	Casos	2 (.02)	18 (.20)	72 (.78)	0,9	0.50 – 1.59	0,7	
	Controles	2 (.02)	29 (.23)	94 (.75)				
Temprana	Casos	1 (.02)	10 (.17)	48 (.81)	1,3	0.58 – 2.74	0,56	
	Controles	1 (.02)	15 (.15)	87 (.84)				
Intermedia	Casos	3 (.02)	31 (.20)	123 (.78)	0,9	0.54 – 1.36	0,51	
	Controles	3 (.032)	43 (.24)	136 (.75)				
Tardía	Casos	0 (.00)	5 (.25)	15 (.75)	1	0.34 – 3.12	0,97	
	Controles	0 (.00)	12 (.24)	37 (.76)				

TMC5 <a href="#">rs2245086</a>	España - Centro			España - Cataluña		
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p ( $\chi^2$ )
Todos	Casos 179 (.72)	58 (.23)	11 (.04)	0,9	0,68 – 1,28	0,67
	Controles 256 (.72)	95 (.27)	7 (.02)			
ApoE4 +	Casos 83 (.66)	34 (.27)	9 (.07)	0,6	0,33 – 1,16	0,13
	Controles 41 (.76)	11 (.20)	2 (.04)			
ApoE4 –	Casos 215 (.71)	24 (.20)	2 (.02)	1,4	0,90 – 2,21	0,13
	Controles 215 (.71)	84 (.28)	5 (.02)			
Mujeres	Casos 114 (.73)	35 (.22)	8 (.05)	0,9	0,57 – 1,34	0,58
	Controles 142 (.72)	52 (.26)	3 (.02)			
Varones	Casos 65 (.71)	23 (.25)	3 (.03)	1	0,62 – 1,74	0,89
	Controles 89 (.70)	36 (.28)	3 (.02)			
Temprana	Casos 41 (.71)	15 (.26)	2 (.03)	1	0,57 – 1,93	0,89
	Controles 71 (.69)	29 (.28)	3 (.03)			
Intermedia	Casos 113 (.70)	40 (.25)	8 (.05)	0,8	0,56 – 1,26	0,4
	Controles 134 (.72)	48 (.26)	4 (.02)			
Tardía	Casos 18 (.86)	2 (.10)	1 (.05)	1,2	0,36 – 3,91	0,78
	Controles 42 (.78)	12 (8,2)	0 (.00)			

GENES INDUCIDOS POR SOBREENPRESIÓN DE APP						
GPNMB <a href="#">rs199348</a>	España - Centro			A1 vs A2		
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p ( $\chi^2$ )
Todos	Casos 59 (.23)	123 (.48)	76 (.29)	1,1	0,87 – 1,37	0,43
	Controles 73 (.20)	175 (.48)	113 (.31)			
ApoE4 +	Casos 25 (.20)	58 (.45)	45 (.35)	1	0,60 – 1,49	0,81
	Controles 7 (.13)	33 (.61)	14 (.26)			
ApoE4 –	Casos <b>34 (.26)</b>	<b>65 (.50)</b>	<b>31 (.24)</b>	<b>1,3</b>	<b>0,97 – 1,74</b>	<b>0,08</b>
	Controles <b>66 (.21)</b>	<b>142 (.46)</b>	<b>99 (.32)</b>			
Mujeres	Casos 33 (.20)	77 (.47)	53 (.33)	1	0,74 – 1,34	0,99
	Controles 40 (8,20)	93 (.47)	64 (.32)			
Varones	Casos 26 (.27)	46 (.48)	23 (.24)	1,2	0,84 – 1,78	0,29
	Controles 28 (.21)	66 (.50)	37 (.28)			
Temprana	Casos <b>15 (.25)</b>	<b>34 (.56)</b>	<b>12 (.20)</b>	<b>1,6</b>	<b>1,00 – 2,47</b>	<b>0,05</b>
	Controles <b>16 (.16)</b>	<b>53 (.51)</b>	<b>34 (.33)</b>			
Intermedia	Casos 38 (.23)	74 (.45)	54 (.33)	0,9	0,66 – 1,19	0,43
	Controles 48 (.25)	86 (.46)	55 (.29)			
Tardía	Casos 3 (.14)	12 (.57)	6 (.29)	1,2	0,59 – 2,53	0,58
	Controles 6 (.11)	29 (.54)	19 (.35)			

GPNMB <a href="#">rs858239</a>	España - Centro			A1 vs A2		
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p ( $\chi^2$ )
Todos	Casos 70 (.28)	122 (.49)	59 (.24)	0,9	0,75 – 1,18	0,58
	Controles 105 (.30)	171 (.48)	78 (.22)			
ApoE4 +	Casos 40 (.32)	58 (.47)	26 (.21)	1	0,63 – 1,58	0,98
	Controles 13 (.25)	32 (.62)	7 (.13)			
ApoE4 –	Casos 30 (.24)	64 (.50)	33 (.26)	0,8	0,62 – 1,11	0,21
	Controles 92 (.30)	139 (.46)	71 (.24)			
Mujeres	Casos 50 (.32)	75 (.48)	32 (.20)	1,1	0,82 – 1,50	0,49
	Controles 56 (.29)	91 (.48)	44 (.23)			
Varones	Casos 20 (.21)	47 (.50)	27 (.29)	0,8	0,52 – 1,11	0,16
	Controles 37 (.28)	64 (.49)	29 (.22)			
Temprana	Casos <b>8 (.14)</b>	<b>34 (.59)</b>	<b>16 (.28)</b>	<b>0,6</b>	<b>0,36 – 0,91</b>	<b>0,02</b>
	Controles <b>32 (.31)</b>	<b>52 (.51)</b>	<b>18 (.18)</b>			
Intermedia	Casos 52 (.32)	73 (.45)	37 (.23)	1,2	0,88 – 1,61	0,25
	Controles 51 (.28)	83 (.45)	50 (.27)			
Tardía	Casos 6 (.29)	12 (.57)	3 (.14)	0,9	0,43 – 1,82	0,73
	Controles 18 (.33)	29 (.54)	7 (.13)			

COL6A3 <a href="#">rs7599762</a>	España - Centro			A1 vs A2		
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p ( $\chi^2$ )
Todos	Casos 0 (0.00)	40 (.16)	210 (.84)	1	0.67 – 1.56	0,91
	Controles 4 (0.01)	48 (.13)	306 (.85)			
ApoE4 +	Casos 0 (0.00)	18 (.15)	106 (.85)	0,6	0.29 – 1.35	0,23
	Controles 2 (0.04)	8 (.15)	44 (.81)			
ApoE4 –	Casos 0 (0.00)	22 (.17)	104 (.83)	1,2	0.72 – 2.09	0,45
	Controles 2 (0.01)	40 (.13)	262 (.86)			
Mujeres	Casos 0 (0.00)	25 (.16)	133 (.84)	1	0.56 – 1.67	0,9
	Controles 3 (0.02)	26 (.13)	167 (.85)			
Varones	Casos 0 (0.00)	15 (.16)	77 (.84)	1,1	0.53 – 2.12	0,88
	Controles 1 (0.01)	18 (.14)	110 (.85)			
Temprana	Casos 0 (0.00)	10 (.17)	49 (.83)	1,3	0.54 – 2.93	0,6
	Controles 1 (0.01)	12 (.12)	89 (.87)			
Intermedia	Casos 0 (0.00)	22 (.14)	138 (.86)	0,9	0.48 – 1.51	0,58
	Controles 1 (0.01)	28 (.15)	159 (.85)			
Tardía	Casos 0 (0.00)	1 (.05)	20 (.95)	0,3	0.04 – 2.52	0,24
	Controles 1 (0.02)	6 (.11)	47 (.87)			
COL6A3 <a href="#">rs7436</a>	España - Centro			A1 vs A2		
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p ( $\chi^2$ )
Todos	Casos 207 (.81)	44 (.17)	3 (.01)	0,9	0.63 – 1.37	0,72
	Controles 294 (.82)	60 (.17)	3 (.01)			
ApoE4 +	Casos <b>95 (.75)</b>	<b>28 (.22)</b>	<b>3 (.02)</b>	<b>0,3</b>	<b>0.12 – 0.82</b>	<b>0,01</b>
	Controles <b>49 (.91)</b>	<b>5 (.09)</b>	<b>0 (.00)</b>			
ApoE4 –	Casos <b>112 (.88)</b>	<b>16 (.13)</b>	<b>0 (.00)</b>	<b>1,7</b>	<b>0.95 – 2.97</b>	<b>0,07</b>
	Controles <b>245 (.81)</b>	<b>55 (.18)</b>	<b>3 (.01)</b>			
Mujeres	Casos 134 (.84)	23 (.14)	2 (.01)	1	0.61 – 1.75	0,91
	Controles 162 (.83)	32 (.16)	1 (.01)			
Varones	Casos 73 (.77)	21 (.22)	1 (.01)	0,8	0.45 – 1.48	0,5
	Controles 105 (.81)	22 (.17)	2 (.02)			
Temprana	Casos 51 (.84)	10 (.16)	0 (.00)	1,2	0.55 – 2.69	0,63
	Controles 82 (.80)	20 (.20)	0 (.00)			
Intermedia	Casos 128 (.79)	31 (.19)	3 (.02)	0,9	0.53 – 1.38	0,51
	Controles 153 (.82)	31 (.17)	3 (.02)			
Tardía	Casos 18 (.86)	3 (.14)	0 (.00)	1,1	0.27 – 4.21	0,93
	Controles 45 (.85)	8 (.15)	0 (.00)			

COL6A3 <a href="#">rs2645779</a>	España - Centro			A1 vs A2		
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p ( $\chi^2$ )
Todos	Casos <b>11 (.04)</b>	<b>97 (.38)</b>	<b>145 (.57)</b>	<b>0,8</b>	<b>0.60 – 1.02</b>	<b>0,06</b>
	Controles <b>33 (.09)</b>	<b>134 (.38)</b>	<b>187 (.53)</b>			
ApoE4 +	Casos 6 (.05)	48 (.38)	73 (.57)	0,8	0.45 – 1.24	0,26
	Controles 4 (.08)	23 (.43)	25 (.49)			
ApoE4 –	Casos 5 (.04)	49 (.39)	72 (.57)	0,8	0.56 – 1.10	0,16
	Controles 29 (.10)	111 (.37)	161 (.53)			
Mujeres	Casos <b>5 (.03)</b>	<b>61 (.38)</b>	<b>94 (.59)</b>	<b>0,7</b>	<b>0.51 – 1.02</b>	<b>0,07</b>
	Controles <b>18 (.09)</b>	<b>73 (.38)</b>	<b>102 (.53)</b>			
Varones	Casos 6 (.06)	36 (.39)	51 (.55)	0,9	0.59 – 1.34	0,53
	Controles 13 (.10)	47 (.37)	68 (.53)			
Temprana	Casos 4 (.07)	25 (.42)	31 (.52)	1	0.59 – 1.62	0,93
	Controles 8 (.08)	41 (.40)	53 (.52)			
Intermedia	Casos <b>6 (.04)</b>	<b>59 (.36)</b>	<b>98 (.60)</b>	<b>0,7</b>	<b>0.48 – 0.95</b>	<b>0,03</b>
	Controles <b>20 (.11)</b>	<b>67 (.37)</b>	<b>96 (.52)</b>			
Tardía	Casos 1 (.05)	12 (.57)	8 (.38)	1,5	0.69 – 3.26	0,3
	Controles 4 (.07)	19 (.35)	31 (.57)			
CRYAB <a href="#">rs762550</a>	España - Centro			A1 vs A2		
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p ( $\chi^2$ )
Todos	Casos 124 (.50)	102 (.41)	24 (.10)	1,1	0.85 – 1.40	0,49
	Controles 166 (.47)	149 (.42)	38 (.11)			
ApoE4 +	Casos 62 (.50)	51 (.41)	12 (.10)	1,2	0.76 – 2.01	0,39
	Controles 24 (.46)	20 (.38)	8 (.15)			
ApoE4 –	Casos 62 (.50)	51 (.41)	12 (.10)	1,1	0.77 – 1.47	0,69
	Controles 142 (.47)	129 (.43)	30 (.10)			
Mujeres	Casos 77 (.49)	68 (.43)	13 (.08)	1	0.75 – 1.44	0,81
	Controles 96 (.50)	76 (.39)	21 (.11)			
Varones	Casos 47 (.51)	34 (.37)	11 (.12)	1,2	0.80 – 1.80	0,38
	Controles 55 (.43)	58 (.45)	15 (.12)			
Temprana	Casos 27 (.47)	25 (.43)	6 (.10)	1	0.61 – 1.62	0,97
	Controles 46 (.46)	46 (.46)	9 (.9)			
Intermedia	Casos 81 (.50)	64 (.40)	16 (.10)	1,1	0.80 – 1.53	0,54
	Controles 86 (.46)	81 (.44)	19 (.10)			
Tardía	Casos 11 (.52)	8 (.38)	2 (.10)	1	0.46 – 2.24	0,97
	Controles 29 (.56)	16 (.31)	7 (.13)			

CRYAB <a href="#">rs4252583</a>	España - Centro			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%) p ( $\chi^2$ )
Todos	Casos 0 (.00)	3 (.01)	253 (.99)	0,6	0.15 – 2.33 0,46
	Controles 0 (.00)	7 (.02)	353 (.98)		
ApoE4 +	Casos 0 (.00)	1 (.01)	126 (.99)	0,2	0.02 – 2.29 0,16
	Controles 0 (.00)	2 (.04)	51 (.96)		
ApoE4 –	Casos 0 (.00)	2 (.02)	127 (.98)	1	0.18 – 4.94 0,95
	Controles 0 (.00)	5 (.02)	302 (.98)		
Mujeres	Casos 0 (.00)	2 (.01)	159 (.99)	1,2	0.17 – 8.70 0,84
	Controles 0 (.00)	2 (.01)	194 (.99)		
Varones	Casos 0 (.00)	1 (.01)	94 (.99)	0,3	0.03 – 2.35 0,21
	Controles 0 (.00)	5 (.04)	126 (.96)		
Temprana	Casos 0 (.00)	2 (.03)	59 (.97)	1,1	0.19 – 6.85 0,9
	Controles 0 (.00)	3 (.03)	100 (.97)		
Intermedia	Casos 0 (.00)	1 (.01)	163 (.99)	0,3	0.03 – 2.54 0,23
	Controles 0 (.00)	4 (.02)	183 (.98)		
Tardía	Casos 0 (.00)	0 (.00)	21 (1.00)	–	– –
	Controles 0 (.00)	0 (.00)	55 (1.00)		
CRYAB <a href="#">rs14133</a>	España - Centro			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%) p ( $\chi^2$ )
Todos	Casos 38 (.15)	126 (.49)	93 (.36)	1,1	0.87 – 1.39 0,41
	Controles 51 (.14)	165 (.46)	145 (.40)		
ApoE4 +	Casos 16 (.13)	60 (.47)	51 (.40)	0,8	0.52 – 1.31 0,42
	Controles 10 (.19)	24 (.44)	20 (.37)		
ApoE4 –	Casos 22 (.17)	66 (.51)	42 (.32)	1,3	0.96 – 1.73 0,1
	Controles 41 (.13)	141 (.46)	125 (.41)		
Mujeres	Casos 24 (.15)	82 (.50)	57 (.35)	1,1	0.83 – 1.52 0,44
	Controles 27 (.14)	92 (.47)	78 (.40)		
Varones	Casos 14 (.15)	44 (.47)	36 (.38)	1	0.69 – 1.50 0,91
	Controles 20 (.15)	59 (.45)	52 (.40)		
Temprana	Casos 9 (.15)	29 (.48)	23 (.38)	1,1	0.68 – 1.70 0,77
	Controles 16 (.16)	44 (.43)	43 (.42)		
Intermedia	Casos 25 (.15)	84 (.51)	56 (.34)	1,2	0.89 – 1.64 0,23
	Controles 22 (.12)	92 (.59)	74 (.39)		
Tardía	Casos 3 (.14)	10 (.48)	8 (.38)	0,8	0.40 – 1.71 0,6
	Controles 11 (.20)	25 (.45)	19 (.35)		
ZNF804A <a href="#">rs10497655</a>	España - Centro			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%) p ( $\chi^2$ )
Todos	Casos 22 (.09)	105 (.41)	129 (.50)	1	0.79 – 1.30 0,91
	Controles 37 (.10)	134 (.37)	190 (.53)		
ApoE4 +	Casos 12 (.09)	55 (.43)	60 (.47)	1,3	0.78 – 2.14 0,32
	Controles 4 (.07)	20 (.37)	30 (.56)		
ApoE4 –	Casos 10 (.08)	50 (.39)	69 (.53)	0,9	0.65 – 1.24 0,52
	Controles 33 (.11)	114 (.37)	160 (.52)		
Mujeres	Casos 14 (.09)	63 (.39)	85 (.52)	1	0.69 – 1.33 0,8
	Controles 23 8.12)	68 (.35)	106 (.54)		
Varones	Casos 8 (.09)	42 (.45)	44 (.47)	1,2	0.77 – 1.74 0,49
	Controles 9 (.07)	55 (.42)	67 (.51)		
Temprana	Casos 7 (.12)	19 (.32)	324 (.57)	1	0.59 – 1.60 0,9
	Controles 9 (.09)	40 (.39)	54 (.52)		
Intermedia	Casos 8 (.05)	75 (.45)	82 (.50)	0,8	0.64 – 1.22 0,45
	Controles 25 (.13)	64 (.34)	100 (.53)		
Tardía	Casos 4 (.19)	8 (.38)	9 (.43)	1,6	0.75 – 3.39 0,22
	Controles 3 (.06)	24 (.44)	27 (.50)		
IGFBP7 <a href="#">rs3755906</a>	España - Centro			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%) p ( $\chi^2$ )
Todos	Casos 107 (.42)	109 (.42)	41 (.16)	1,1	0.84 – 1.34 0,6
	Controles 130 (.36)	182 (.51)	48 (.13)		
ApoE4 +	Casos 49 (.39)	53 (.42)	25 (.20)	1,3	0.83 – 2.06 0,24
	Controles 15 (.28)	27 (.50)	12 (.22)		
ApoE4 –	Casos 58 (.45)	56 (.43)	16 (.12)	1,2	0.85 – 1.56 0,36
	Controles 115 (.38)	155 (.51)	36 (.12)		
Mujeres	Casos 71 (.44)	68 (.42)	23 (.14)	1,1	0.83 – 1.52 0,47
	Controles 76 (.39)	93 (.47)	28 (.14)		
Varones	Casos 36 (.38)	41 (.43)	18 (.19)	0,9	0.63 – 1.34 0,66
	Controles 45 (.35)	70 (.54)	15 (.12)		
Temprana	Casos 26 (.43)	24 (.39)	11 (.18)	1	0.65 – 1.63 0,91
	Controles 36 (.35)	55 (.53)	12 (.12)		
Intermedia	Casos 70 (.42)	74 (.75)	21 (.13)	1,2	0.88 – 1.63 0,25
	Controles 67 (.36)	94 (.50)	27 (.14)		
Tardía	Casos 7 (.33)	6 (.29)	8 (.38)	0,5	0.23 – 0.98 0,04
	Controles 23 (.43)	25 (.46)	6 (.11)		

IGFBP7 <a href="#">rs4075349</a>	España - Centro			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)
Todos	Casos 63 (.25)	115 (.45)	78 (.30)	1,3	1.06 – 1.67
	Controles 64 (.18)	162 (.45)	136 (.38)		0,01
ApoE4 +	Casos 36 (.28)	58 (.46)	33 (.26)	1,3	0.83 – 2.06
	Controles 12 (.22)	24 (.44)	18 (.33)		0,24
ApoE4 –	Casos 27 (.21)	57 (.44)	45 (.35)	1,2	0.87 – 1.57
	Controles 52 (.17)	138 (.45)	118 (.38)		0,3
Mujeres	Casos 43 (.27)	71 (.44)	48 (.30)	1,3	0.97 – 1.75
	Controles 36 (.18)	93 (.47)	68 (.35)		0,08
Varones	Casos 20 (.21)	44 (.47)	30 (.32)	1,4	0.92 – 1.97
	Controles 22 (.17)	55 (.42)	55 (.42)		0,13
Temprana	Casos 10 (.17)	30 (.50)	20 (.33)	1	0.66 – 1.64
	Controles 18 (.17)	48 (.47)	37 (.36)		0,87
Intermedia	Casos 42 (.25)	72 (.44)	51 (.31)	1,4	1.06 – 1.92
	Controles 31 (.16)	84 (.44)	74 (.39)		0,02
Tardía	Casos 7 (.33)	11 (.52)	3 (.14)	1,8	0.86 – 3.63
	Controles 14 (.25)	22 (.40)	19 (.35)		0,12
GNG12 <a href="#">rs2295942</a>	España - Centro			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)
Todos	Casos 63 (.25)	122 (.49)	66 (.26)	0,9	0.73 – 1.15
	Controles 100 (.28)	167 (.47)	88 (.25)		0,43
ApoE4 +	Casos 33 (.26)	57 (.46)	35 (.28)	0,7	0.43 – 1.09
	Controles 21 (.40)	20 (.38)	12 (.23)		0,11
ApoE4 –	Casos 30 (.24)	65 (.52)	31 (.25)	1	0.72 – 1.29
	Controles 79 (.26)	147 (.49)	76 (.25)		0,81
Mujeres	Casos 39 (.25)	75 (.47)	45 (.28)	0,9	0.67 – 1.22
	Controles 5 (.26)	94 (.49)	48 (.25)		0,53
Varones	Casos 24 (.26)	47 (.51)	21 (.23)	1	0.69 – 1.46
	Controles 40 (.31)	55 (.42)	36 (.27)		0,98
Temprana	Casos 14 (.24)	28 (.47)	17 (.29)	0,8	0.53 – 1.31
	Controles 30 (.29)	46 (.45)	26 (.25)		0,44
Intermedia	Casos 41 (.25)	80 (.49)	41 (.25)	0,9	0.64 – 1.16
	Controles 56 (.30)	89 (.48)	42 (.22)		0,32
Tardía	Casos 6 (.30)	10 (.50)	4 (.20)	1,6	0.74 – 3.23
	Controles 10 (.20)	25 (.49)	16 (.31)		0,24

IGFBP7 <a href="#">rs4075349</a>	España - Cataluña			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)
Todos	Casos 61 (.18)	173 (.51)	103 (.31)	1,2	0.90 – 1.47
	Controles 34 (.15)	110 (.50)	77 (.35)		0,25
ApoE4 +	Casos 34 (.20)	87 (.52)	47 (.28)	1,5	0.89 – 2.57
	Controles 4 (.11)	18 (.50)	14 (.39)		0,12
ApoE4 –	Casos 27 (.16)	86 (.51)	55 (.33)	1	0.76 – 1.39
	Controles 30 (.16)	91 (.49)	63 (.34)		0,86
Mujeres	Casos 38 (.16)	126 (.53)	75 (.31)	1	0.75 – 1.41
	Controles 19 (.16)	61 (.51)	39 (.33)		0,87
Varones	Casos 23 (.23)	47 (.48)	28 (.29)	1,4	0.96 – 2.13
	Controles 15 (.15)	49 (.48)	38 (.37)		0,08
Temprana	Casos 6 (.38)	10 (.63)	0 (.00)	3,6	1.49 – 8.74
	Controles 3 (.08)	22 (.59)	12 (.32)		0,003
Intermedia	Casos 51 (.17)	156 (.51)	100 (.33)	1,1	0.81 – 1.39
	Controles 29 (.17)	84 (.48)	62 (.35)		0,66
Tardía	Casos 4 (.31)	6 (.46)	3 (.23)	1,6	0.42 – 5.76
	Controles 1 (.14)	4 (.57)	2 (.29)		0,51
MMP2 <a href="#">rs2287073</a>	España - Centro			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)
Todos	Casos 193 (.75)	62 (.24)	2 (.01)	1	0.73 – 1.44
	Controles 270 (.95)	89 (.25)	3 (.01)		0,88
ApoE4 +	Casos 100 (.78)	26 (.20)	2 (.02)	1,1	0.57 – 2.21
	Controles 40 (.74)	14 (.26)	0 (.00)		0,74
ApoE4 –	Casos 93 (.72)	36 (.28)	0 (.00)	0,9	0.61 – 1.42
	Controles 230 (.75)	75 (.24)	3 (.01)		0,75
Mujeres	Casos 119 (.73)	42 (.26)	1 (.01)	1	0.61 – 1.46
	Controles 148 (.75)	47 (.24)	2 (.01)		0,8
Varones	Casos 74 (.78)	20 (.21)	1 (.01)	1,1	0.59 – 1.88
	Controles 101 (.77)	30 (.23)	1 (.01)		0,86
Temprana	Casos 44 (.72)	17 (.28)	0 (.00)	0,9	0.48 – 1.79
	Controles 76 (.74)	27 (.26)	0 (.00)		0,83
Intermedia	Casos 124 (.75)	40 (.24)	1 (.01)	1,2	0.76 – 1.80
	Controles 137 (.72)	49 (.26)	3 (.02)		0,48
Tardía	Casos 19 (.90)	2 (.10)	0 (.00)	2	0.42 – 9.54
	Controles 45 (.82)	10 (.18)	0 (.00)		0,38



MMP2 <a href="#">rs2287074</a>	España - Centro				A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p (χ <sup>2</sup> )
Todos	Casos 102 (.40)	108 (.42)	45 (.18)	1,1	0.91 – 1.44	0,27
	Controles 125 (.35)	170 (.47)	67 (.19)			
ApoE4 +	Casos 55 (.43)	50 (.39)	22 (.17)	126	0.80 – 2.00	0,32
	Controles 17 (.31)	28 (.52)	9 (.17)			
ApoE4 –	Casos 47 (.37)	58 (.45)	23 (.18)	1,1	0.78 – 1.42	0,73
	Controles 108 (.635)	142 (.46)	58 (.19)			
Mujeres	Casos 62 (.39)	69 (.43)	30 (.19)	1	0.75 – 1.37	0,94
	Controles 72 (.37)	91 (.46)	34 (.17)			
Varones	Casos 40 (.43)	39 (.41)	15 (.16)	1,4	0.98 – 2.11	0,06
	Controles 42 (.32)	60 (.45)	30 (.23)			
Temprana	Casos 20 (.33)	29 (.48)	12 (.20)	1	0.61 – 1.50	0,83
	Controles 33 (.32)	53 (.51)	17 (.17)			
Intermedia	Casos 70 (.43)	63 (.39)	30 (.18)	1,2	0.87 – 1.59	0,3
	Controles 70 (.37)	81 (.43)	38 (.20)			
Tardía	Casos 9 (.43)	10 (.48)	2 (.10)	1,7	0.82 – 3.63	0,15
	Controles 14 (.25)	31 (.56)	10 (.18)			

GENES CAUSANTES DE LA FORMA MONOGENICA DE LA ENFERMEDAD						
PSEN1 <a href="#">rs3025786</a>	España - Centro				A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p (χ <sup>2</sup> )
Todos	Casos 6 (.02)	35 (.14)	218 (.84)	1,2	0.79 – 1.79	0,4
	Controles 3 (.01)	50 (.14)	309 (.85)			
ApoE4 +	Casos 2 (.02)	13 (.10)	114 (.88)	0,5	0.22 – 1.00	0,05
	Controles 1 (.02)	12 (.22)	41 (.76)			
ApoE4 –	Casos 4 (.03)	22 (.17)	104 (.80)	1,8	1.09 – 2.92	0,02
	Controles 2 (.01)	38 (.12)	268 (.87)			
Mujeres	Casos 2 (.01)	21 (.13)	141 (.86)	0,8	0.48 – 1.40	0,47
	Controles 1 (.01)	34 (.17)	162 (.82)			
Varones	Casos 4 (.04)	14 (.15)	77 (.81)	2	1.04 – 3.98	0,04
	Controles 1 (.01)	14 (.11)	117 (.89)			
Temprana	Casos 2 (.03)	11 (.18)	48 (.79)	1,6	0.75 – 3.25	0,23
	Controles 1 (.01)	15 (.15)	87 (.84)			
Intermedia	Casos 4 (.02)	21 (.13)	142 (.85)	1,1	0.67 – 1.96	0,62
	Controles 2 (.01)	25 (.13)	162 (.86)			
Tardía	Casos 0 (.00)	3 (.14)	18 (.86)	1,3	0.32 – 5.59	0,69
	Controles 0 (.00)	6 (.11)	49 (.89)			

MMP2 <a href="#">rs7201</a>	España - Centro				A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p (χ <sup>2</sup> )
Todos	Casos 44 (.17)	121 (.48)	89 (.35)	0,9	0.72 – 1.14	0,41
	Controles 72 (.20)	170 (.47)	119 (.33)			
ApoE4 +	Casos 18 (.14)	64 (.51)	44 (.65)	0,9	0.54 – 1.35	0,5
	Controles 13 (.24)	21 (.39)	20 (.37)			
ApoE4 –	Casos 26 (.20)	57 (.45)	45 (.35)	1	0.72 – 1.29	0,81
	Controles 59 (.19)	149 (.49)	99 (.32)			
Mujeres	Casos 27 (.17)	72 (.45)	61 (.38)	0,9	0.64 – 1.17	0,35
	Controles 41 (.21)	86 (.44)	69 (.35)			
Varones	Casos 17 (.18)	49 (.52)	28 (.30)	0,9	0.61 – 1.36	0,72
	Controles 29 (.22)	63 (.48)	40 (.30)			
Temprana	Casos 12 (.20)	30 (.49)	19 (.31)	1,1	0.71 – 1.75	0,65
	Controles 16 (.16)	53 (.52)	33 (.32)			
Intermedia	Casos 27 (.17)	76 (.47)	59 (.36)	0,8	0.61 – 1.11	0,2
	Controles 43 (.23)	84 (.44)	62 (.33)			
Tardía	Casos 2 (.10)	11 (.52)	8 (.38)	0,7	0.32 – 1.39	0,28
	Controles 11 (.20)	28 (.51)	16 (.29)			

PSEN1 <a href="#">rs3025786</a>	España - Cataluña				A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p (χ <sup>2</sup> )
Todos	Casos 4 (.01)	51 (.15)	287 (.84)	0,9	0.59 – 1.34	0,56
	Controles 3 (.01)	37 (.17)	183 (.82)			
ApoE4 +	Casos 2 (.01)	25 (.15)	145 (.84)	0,5	0.24 – 1.08	0,07
	Controles 0 (.00)	11 (.31)	25 (.69)			
ApoE4 –	Casos 2 (.01)	26 (.15)	141 (.83)	1	0.61 – 1.74	0,9
	Controles 3 (.02)	26 (.14)	157 (.84)			
Mujeres	Casos 4 (.02)	41 (.17)	199 (.82)	1,1	0.65 – 1.86	0,73
	Controles 3 (.03)	16 (.13)	100 (.84)			
Varones	Casos 0 (.00)	10 (.10)	88 (.90)	0,5	0.22 – 1.04	0,06
	Controles 0 (.00)	21 (.20)	83 (.80)			
Temprana	Casos 0 (.00)	1 (.06)	15 (.94)	0,3	0.04 – 2.62	0,26
	Controles 1 (.03)	5 (.14)	31 (.84)			
Intermedia	Casos 4 (.01)	48 (.15)	260 (.83)	0,9	0.59 – 1.45	0,74
	Controles 2 (.01)	30 (.17)	145 (.82)			
Tardía	Casos 0 (.00)	2 (.15)	11 (.85)	0,5	0.06 – 4.00	0,51
	Controles 0 (.00)	2 (.29)	5 (.71)			

## GENES RELACIONADOS CON EL METABOLISMO DEL COLESTEROL

PSEN1 <a href="#">rs165932</a>	España - Centro			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%) p (χ <sup>2</sup> )
Todos	Casos 64 (.24)	139 (.52)	64 (.24)	0,8	0,63 – 1,00 0,05
	Controles 103 (.30)	175 (.31)	65 (.19)		
ApoE4 +	Casos 29 (.21)	70 (.51)	37 (.27)	0,8	0,53 – 1,29 0,4
	Controles 13 (.24)	30 (.56)	11 (.20)		
ApoE4 –	Casos 35 (.27)	69 (.52)	28 (.21)	0,9	0,65 – 1,16 0,33
	Controles 90 (.31)	145 (.50)	54 (.19)		
Mujeres	Casos 42 (.25)	87 (.52)	38 (.23)	0,9	0,67 – 1,19 0,43
	Controles 56 (.27)	111 (.54)	39 (.19)		
Varones	Casos 22 (.22)	52 (.51)	27 (.27)	0,7	0,47 – 0,97 0,03
	Controles 46 (.34)	64 (.47)	23 (.19)		
Temprana	Casos 14 (.23)	33 (.53)	15 (.24)	0,7	0,44 – 1,15 0,17
	Controles 24 (.33)	35 (.49)	13 (.18)		
Intermedia	Casos 42 (.24)	94 (.54)	39 (.22)	0,8	0,60 – 1,07 0,14
	Controles 61 (.30)	104 (.52)	36 (.18)		
Tardía	Casos 5 (.24)	6 (.29)	10 (.48)	0,5	0,24 – 1,02 0,06
	Controles 16 (.29)	29 (.53)	10 (.18)		

## GENES RELACIONADOS CON EL METABOLISMO DE LA HOMOCISTEÍNA

MTHFR <a href="#">rs1801133</a>	España - Centro			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%) p (χ <sup>2</sup> )
Todos	Casos 82 (.34)	124 (.51)	35 (.15)	1,1	0,85 – 1,38 0,53
	Controles 116 (.37)	128 (.41)	67 (.22)		
ApoE4 +	Casos 39 (.33)	71 (.59)	10 (.08)	1,4	0,87 – 2,24 0,21
	Controles 15 (.33)	19 (.42)	11 (.24)		
ApoE4 –	Casos 43 (.36)	53 (.44)	25 (.21)	1	0,70 – 1,30 0,79
	Controles 101 (.38)	109 (.41)	56 (.21)		
Mujeres	Casos 54 (.35)	77 (.50)	23 (.15)	1,1	0,82 – 1,51 0,51
	Controles 64 (.35)	85 (.46)	36 (.19)		
Varones	Casos 28 (.32)	47 (.54)	12 (.14)	1,1	0,72 – 1,58 0,76
	Controles 50 (.41)	42 (.34)	31 (.25)		
Temprana	Casos 22 (.42)	22 (.42)	9 (.17)	1,4	0,82 – 2,32 0,23
	Controles 23 (.35)	26 (.39)	17 (.26)		
Intermedia	Casos 52 (.31)	94 (.56)	21 (.13)	0,9	0,65 – 1,18 0,38
	Controles 78 (.41)	79 (.42)	31 (.16)		
Tardía	Casos 8 (.38)	8 (.38)	5 (.24)	1,6	0,78 – 3,28 0,2
	Controles 14 (.24)	22 (.40)	19 (.35)		

## GENES RELACIONADOS CON EL METABOLISMO DEL COLESTEROL

ABCA2 <a href="#">rs908832</a>	España - Centro			A1 vs A2	
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%) p (χ <sup>2</sup> )
Todos	Casos 242 (.94)	15 (.05)	0 (.00)	0,9	0,45 – 1,78 0,76
	Controles 343 (.95)	19 (.05)	0 (.00)		
ApoE4 +	Casos 119 (.94)	8 (.06)	0 (.00)	0,6	0,12 – 2,78 0,49
	Controles 52 (.96)	2 (.04)	0 (.00)		
ApoE4 –	Casos 123 (.95)	7 (.05)	0 (.00)	1	0,42 – 2,50 0,96
	Controles 291 (.94)	17 (.06)	0 (.00)		
Mujeres	Casos 152 (.94)	10 (.06)	0 (.00)	0,9	0,38 – 2,15 0,82
	Controles 186 (.94)	11 (.06)	0 (.00)		
Varones	Casos 90 (.95)	5 (.05)	0 (.00)	0,9	0,26 – 2,86 0,81
	Controles 126 (.95)	6 (.05)	0 (.00)		
Temprana	Casos 59 (.97)	2 (.03)	0 (.00)	1,2	0,21 – 6,58 0,84
	Controles 99 (.96)	4 (.04)	0 (.00)		
Intermedia	Casos 154 (.93)	11 (.07)	0 (.00)	1	0,41 – 2,18 0,91
	Controles 177 (.93)	12 (.06)	0 (.00)		
Tardía	Casos 20 (.95)	1 (.05)	0 (.00)	1,2	0,12 – 1,37 0,91
	Controles 52 (.95)	3 (.05)	0 (.00)		

GENES DE REPARACIÓN DE DAÑOS EN EL ADN

MTRR <a href="#">rs1801394</a>	España - Centro			A1 vs A2		
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p (χ <sup>2</sup> )
Todos	Casos	57 (.30)	38 (.20)	1,3	0,97 – 1,67	0,08
	Controles	56 (.23)	61 (.25)			
ApoE4 +	Casos	27 (.28)	48 (.49)	1,2	0,67 – 2,06	0,57
	Controles	6 (.18)	7 (.21)			
ApoE4 –	Casos	30 (.33)	45 (.49)	1,4	1,00 – 2,01	0,05
	Controles	50 (.24)	54 (.26)			
Mujeres	Casos	38 (.32)	63 (.53)	1,5	1,04 – 2,06	0,03
	Controles	34 (.23)	37 (.25)			
Varones	Casos	19 (.28)	30 (.43)	1	0,65 – 1,58	0,95
	Controles	22 (.24)	47 (.51)			
Temprana	Casos	8 (.26)	17 (.55)	1,1	0,49 – 2,63	0,77
	Controles	7 (.19)	11 (.30)			
Intermedia	Casos	42 (.30)	67 (.48)	1,3	0,91 – 1,73	0,17
	Controles	37 (.24)	77 (.50)			
Tardía	Casos	75 (.39)	9 (.50)	1,6	0,74 – 3,58	0,22
	Controles	11 (.23)	28 (.58)			

GENES DE LA FAMILIA MULTIGÉNICA DE LAS PROTEÍNAS 14-3-3

YWHAB <a href="#">rs3208334</a>	España - Centro			A1 vs A2		
	A1	Ambos	A2	OR	IC (95%)	p (χ <sup>2</sup> )
Todos	Casos	37 (.14)	111 (.43)	1,2	0,90 – 1,46	0,26
	Controles	39 (.12)	138 (.42)			
ApoE4 +	Casos	16 (.13)	56 (.44)	1,9	1,11 – 3,26	0,02
	Controles	2 (.04)	18 (.35)			
ApoE4 –	Casos	21 (.16)	55 (.42)	1,1	0,82 – 1,52	0,48
	Controles	37 (.13)	120 (.43)			
Mujeres	Casos	24 (.15)	70 (.43)	1,1	0,83 – 1,53	0,44
	Controles	24 (.12)	83 (.42)			
Varones	Casos	13 (.14)	41 (.44)	1,2	0,79 – 1,73	0,45
	Controles	15 (.11)	55 (.42)			
Temprana	Casos	12 (.20)	23 (.38)	1,6	1,09 – 3,12	0,02
	Controles	6 (.08)	24 (.34)			
Intermedia	Casos	21 (.13)	71 (.43)	0,9	0,71 – 1,31	0,8
	Controles	26 (.14)	80 (.42)			
Tardía	Casos	2 (.10)	9 (.43)	1	0,45 – 2,07	0,92
	Controles	5 (.09)	25 (.45)			



**Tabla R2.** Distribuciones alélicas y genotípicas de los SNPs estudiados en cada muestra analizada.

Para cada SNP se muestra el número de individuos y las frecuencias (entre paréntesis) de individuos homocigotos para el alelo 1 (A1), para el alelo 2 (A2) y para los individuos heterocigotos (Ambos) en toda la muestra caso - control de España - Centro, España - Cataluña o Canadá y en los distintos estratos de la muestra

Se indican en cada estrato los riesgos relativos (OR), los intervalos de confianza al 95% y el valor p para el test  $\chi^2$ .

En color rojo se indica si se encuentra asociación estadísticamente significativa al 95% (valor  $p < 0.05$ , riesgo), en color naranja la asociación estadísticamente significativa al 90% ( $0.05 < \text{valor } p < 0.1$ , tendencia), y en negro se indican los casos en los que no se encuentra asociación con la EA estadísticamente significativa.



---

## ANEXO II

---



---

## ANEXO II-A

---



**Enfermedad de Alzheimer.  
Genes y mecanismos moleculares****Ana Martínez García  
María J. Bullido**

La etiología y los mecanismos moleculares responsables del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (EA) continúa siendo desconocida, aunque las numerosas evidencias acumuladas en la última década indican que ésta es una enfermedad de naturaleza multifactorial y que en ella influyen factores genéticos y ambientales interaccionando entre sí. En un escaso porcentaje de enfermos se transmite de padres a hijos con un patrón mendeliano autosómico dominante y con una alta penetrancia, constituyendo la **forma monogénica de la EA**; por otra parte, está claramente establecido que, además del envejecimiento –el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la enfermedad- otro factor de riesgo es el ser familiar en primer grado de un paciente con EA, incluso en los casos en que no hay una clara transmisión genética (**EA compleja o esporádica**).

Las formas monogénica y esporádica de la EA no se diferencian de forma clara en los síntomas, en la evolución ni en los parámetros clínicos y neuropatológicos estudiados hasta ahora, lo que indica que debe existir mecanismos patogénicos comunes. El conocimiento de estos mecanismos patogénicos, necesario para un desarrollo racional de estrategias diagnósticas y terapéuticas, es una de las principales aplicaciones de los estudios sobre la genética molecular de la EA.

**1.- FACTORES GENÉTICOS DE LA EA MONOGENICA**

En el pequeño porcentaje de casos (1-5 %) que componen este grupo de EA, la enfermedad se transmite de forma autosómica dominante con penetrancia de prácticamente el 100%. En la mayoría de estos casos los síntomas se presentan antes de los 65 años, correspondiendo por tanto a la forma precoz o presenil de la EA.

**1.1.- Causas de la EA genética: Mutaciones**

El análisis genético de familias con un fuerte componente hereditario en el desarrollo de la EA ha conducido hasta el momento al descubrimiento de tres loci ligados a EA monogénica (en los cromosomas 21, 14 y 1), y a la identificación de los genes que codifican sus productos: la proteína precursora del amiloide ? (**APP**) en el cromosoma 21, y las presenilinas 1 (**PSEN1**) en el cromosoma 14 y 2 (**PSEN2**) en el 1. Las mutaciones en estos tres genes explican la mayor parte de los casos de EA monogénica de comienzo temprano, aunque la frecuencia de casos que obedecen a mutaciones en cada uno de ellos es distinta: las mutaciones en los PSEN2 y APP son muy infrecuentes, mientras que las de PSEN1 explican la gran mayoría de casos de esta forma de EA. Dado que hay familias con una forma claramente hereditaria de EA en las que no se detectan mutaciones en ninguno de estos genes, es probable que haya más genes con mutaciones causantes de EA o mutaciones en regiones reguladoras de estos genes, exploradas en menor profundidad que las codificantes<sup>1, 2</sup>.

**Mutaciones en el gen APP.** El grupo de Glenner y Wong descubrió en 1991 que el componente mayoritario de los depósitos amiloides (placas amiloides o seniles) distribuidos a lo largo del parénquima de los cerebros de pacientes con EA era un



pequeño péptido (40-42 aminoácidos) que se denominó amiloide beta (A $\beta$ ) <sup>3</sup>; además, demostraron que las placas también se encontraban en el cerebro de pacientes con trisomía del cromosoma 21 (síndrome de Down), lo que constituyó una de las primeras indicaciones de que podría haber alguna alteración genética asociada a la EA en este cromosoma <sup>4</sup>. La secuenciación del péptido A $\beta$  no mostró homología con proteínas conocidas en la época, pero permitió aislar el gen que codificaba una proteína que contenía en su secuencia al péptido A $\beta$ , que mapeaba en la región q21 del cromosoma <sup>5-8</sup>, y que se denominó "proteína precursora del amiloide" o APP.

Finalmente, el descubrimiento de la mutación Ile717Val en el APP <sup>9</sup> mostró de forma definitiva que, al menos en algunos casos, la EA se heredaba con mutaciones en el APP. Este hallazgo proporcionó un fuerte respaldo a la hipótesis de que el péptido A $\beta$  era un elemento fundamental en la etiopatogenia de la EA. De hecho, y aunque tiene puntos débiles, la hipótesis de la "cascada amiloide", desarrollada a lo largo de la última década, que establece que la formación y agregación del péptido A $\beta$  es el evento que desencadena las demás alteraciones observadas en la EA <sup>10,11</sup>, continúa actualmente vigente y es la base de varias aproximaciones farmacológicas en estudio.

**Mutaciones en los genes de las Presenilinas.** Prácticamente en paralelo con el descubrimiento de las mutaciones en APP, los estudios de ligamiento sistemático en una gran cantidad de familias llevaron al convencimiento de que la EA era genéticamente heterogénea <sup>12,13</sup>, lo que llevó en la primera mitad de los años noventa a realizar numerosos barridos genéticos en familias para localizar otros genes portadores de mutaciones. De hecho, un trabajo anterior al hallazgo de la primera mutación en APP ya había señalado al cromosoma 14 como portador de *loci* ligados a EA familiar <sup>14</sup>.

Las evidencias de que el gen principal de la EA monogénica de inicio precoz estaba en el cromosoma 14 se fueron acumulando al estudiar un elevado número de familias, y se publicaron en el año 1992 <sup>15-18</sup>. Finalmente, en 1995 se aisló a la presenilina 1 como el principal gen portador de mutaciones responsables de EA monogénica <sup>19</sup>: denominada así por su descubrimiento como causante de EA presenil, la presenilina 1 está codificada por un gen (PSEN1) mapeado en la región q24.3 del cromosoma 14. La predicción de su estructura secundaria la presenta como una proteína integral de membrana, con ocho dominios transmembrana, y se localiza mayoritariamente en membranas asociadas al RE. Ya se han identificado en la región codificante de este gen más de 80 mutaciones distintas (<http://www.alzforum.org>), además de mutaciones y polimorfismos en la región promotora <sup>1,2,20</sup>, cada una de las cuales causa EA en una sola o en un grupo muy escaso de familias, siendo así de las denominadas "mutaciones particulares". La mayoría de estas mutaciones se deben al cambio de una base en el genoma que da lugar a un cambio de aminoácido en la proteína (mutación "missense"), excepto dos delecciones. Salvo escasas excepciones <sup>21,22</sup>, todas tienen una penetrancia del 100%. Las mutaciones patogénicas se extienden a lo largo de toda la estructura de la proteína, aunque se concentran en dos exones (el 5 y, principalmente, el 8) que codifican dominios transmembrana, sugiriendo que el mantenimiento estructural de dichas regiones es fundamental para la funcionalidad de la proteína. Las mutaciones en PSEN1 son responsables de la gran mayoría de los casos de EA monogénica, y son también por regla general las más agresivas en cuanto a un inicio muy precoz de los síntomas y a una evolución rápida <sup>23</sup>.

Poco después del hallazgo del gen PSEN1 se identificó el gen de la presenilina 2 (PSEN2) como portador de mutaciones responsables del ligamiento de la EA con el cromosoma 1 <sup>24,25</sup>. Las mutaciones descritas en este gen (<http://www.alzforum.org>) son mucho menos abundantes que las de PSEN1, y la mayoría de ellas se encuentra en los dominios transmembrana conservados entre las dos proteínas.



## 1.2.-Funciones de la APP y las presenilinas en relación con la EA.

Desde su descubrimiento como causantes de EA hasta la actualidad se han realizado un gran número de estudios destinados a averiguar las funciones de estas proteínas y a cuál o cuáles de esas funciones afectan las mutaciones. Ya que se sabe que todas las mutaciones patogénicas alteran la producción y/o agregación del péptido A $\beta$ , daremos algunos apuntes sobre el efecto de las mutaciones sobre la proteólisis del APP. A pesar de que este aspecto ha centrado muchos de los ensayos funcionales de estas proteínas, no está aún claramente demostrado que éste sea el evento central de todas las formas de EA.

La proteína APP es precursora del A $\beta$ . Es una glicoproteína transmembrana <sup>26</sup>, cuyo mRNA da lugar por procesamiento alternativo a isoformas de 695 a 770 aminoácidos. Se sintetiza en el Retículo Endoplásmico, desde donde viaja vía aparato de Golgi y vesículas secretoras a la membrana plasmática. En las vesículas o en la propia membrana, algunas moléculas de APP sufren un corte proteolítico que da lugar a la secreción de un largo fragmento de APP soluble; este tipo de procesamiento lo lleva a cabo una enzima denominada  $\gamma$ -secretasa y se conoce como no amiloidogénico, puesto que evita la formación del péptido A $\beta$ . Sin embargo, la APP de la membrana plasmática puede ser reinternalizada vía vesículas recubiertas de clatrina y, a través de la vía endosomas-lisosomas, o bien en el propio RE <sup>27</sup>, dar lugar a la generación de A $\beta$ , mediante la acción de la  $\beta$  y la  $\gamma$ -secretasas. Las presenilinas 1 y 2 se han localizado en el RE y en el aparato de Golgi, y parece que tienen una organización topográfica semejante <sup>28, 29</sup>.

Aunque no se conocen exactamente las funciones del APP, ni cuáles están alteradas en los mutantes, todas sus mutaciones patogénicas están situadas en o alrededor del A $\beta$  y se concentran alrededor de los sitios de corte de las secretasas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , cuya acción conjunta da lugar al A $\beta$  (fig. 1); esto sugiere que la generación del A $\beta$  es el principal vínculo entre APP y la EA. De hecho, los estudios realizados en modelos celulares y animales indican que todas las mutaciones del APP dan lugar a una sobreproducción del péptido A $\beta$  (revisión en 30).

Tampoco se conocen con exactitud las funciones celulares de las PSEN, pero datos recientes de diferentes laboratorios apuntan a que están implicadas en el procesamiento de APP a nivel de la actividad  $\gamma$ -secretasa, existiendo incluso una co-purificación de PSEN1 en purificaciones parciales de la actividad  $\gamma$ -secretasa <sup>31, 32</sup>, por lo que se ha sugerido que ellas mismas podrían serlo, o regular su acción muy directamente <sup>33</sup>. Mutaciones de las presenilinas asociadas a EA provocan aumento en la producción del péptido A $\beta$  <sup>42-43</sup> <sup>34</sup>. Por otra parte, se sabe que las PSEN son necesarias para el desarrollo del sistema nervioso <sup>35, 36</sup>, posiblemente por su implicación en la vía de señalización de Notch <sup>37</sup>. Datos recientes, obtenidos principalmente en modelos transgénicos y KO, muestran que las mutaciones en las PSEN afectan de manera diferencial al procesamiento de APP y de Notch <sup>38</sup>.

## 2.- FACTORES GENÉTICOS DE LA EA COMPLEJA

La gran mayoría de los casos de EA son esporádicos o presentan limitada agregación familiar y suelen ser de aparición tardía (después de los 60-65 años). Las causas suficientes de la EA compleja son las combinaciones de, al menos, una tríada de factores: debidos al envejecimiento, ambientales y genéticos. Ni los factores genéticos ni los ambientales actuando por separado causan la enfermedad, siendo ambos necesarios pero no suficientes para su desarrollo. La evidencia de que hay factores genéticos implicados en la EA esporádica (o "no genética") deriva de la observación de que el riesgo de padecerla es mayor en individuos con antecedentes familiares de demencia; estos factores genéticos, actuarían en distintas combinaciones que determinarían el riesgo genético de enfermedad en los diferentes individuos. El averiguar cuántos factores genéticos son y en qué combinaciones



actúan es el objetivo de los estudios de genética de la EA esporádica. Se prevé que esto permitirá la elaboración de unos "perfiles de riesgo" que servirán para predecir de forma fiable la probabilidad de que un individuo pueda o no padecer la enfermedad y responder o no a un tratamiento.

## 2.1.- Genes implicados en la susceptibilidad para EA: APOE

De los múltiples *loci* y genes candidatos (más de cincuenta, ver página Web <http://www.alzforum.org>) que hasta la fecha se han descrito como factores de susceptibilidad para la EA, el único que se repite de manera constante es el de la apolipoproteína E (APOE, gen, ApoE, proteína; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/dispomim.cgi?id=107741> ), siendo así el principal gen de susceptibilidad conocido para la EA.

En el año 1993, y como resultado de una búsqueda sistemática en familias en las que previamente se había encontrado ligamiento con el cromosoma 19 <sup>39</sup>, se identificó al gen APOE como el responsable del ligamiento de la EA con un locus en el cromosoma 19 en familias con EA tardía <sup>40</sup>. Concretamente, se encontró un fuerte ligamiento de la herencia del alelo 4 de este gen (apoE4) con la enfermedad. Se comprobó que este alelo estaba asociado con riesgo tanto como en individuos portadores que no tenían antecedentes familiares de demencia, y que se asociaba a casos tanto precoces como tardíos, disminuyendo la edad de aparición de los síntomas de forma dependiente de la dosis alélica de ApoE4 <sup>41</sup>. Este hallazgo resultó sorprendente, ya que la ApoE era muy conocida por su implicación en el transporte de lípidos y colesterol entre órganos periféricos, pero no se sabía que tuviera ningún papel relevante en el sistema nervioso central.

La ApoE presenta tres isoformas comunes (E2, E3 y E4) codificadas por un único gen del cromosoma 19 <sup>42,43</sup>. En el cerebro son los astrocitos y la microglía las principales células productoras de ApoE, jugando un importante papel en el mecanismo de regeneración neuronal; estas células liberan ApoE al medio para poder captar los lípidos y el colesterol de las membranas neuronales dañadas por el trauma <sup>44</sup>; aunque en menor cantidad, parece que en el cerebro humano también las neuronas producen ApoE <sup>45</sup>.

El gen APOE humano está constituido por cuatro exones y tres intrones, y por un promotor muy complejo que contiene numerosos elementos de regulación implicados en su expresión (ver revisión en <sup>46</sup>). El alelo apoE4 está ampliamente sobrerrepresentado en los enfermos con EA (40% frente a un 5 20%) pero, además, parece que desvía en unos 20 años la edad de comienzo de la EA tardía: en homocigotos 4,4 el inicio ocurriría antes de los 70 años, y en el genotipo APOE2,3 el inicio ocurriría después de los 90 años. <sup>47</sup>.

El mecanismo por el cual apoE4 está implicado en la EA no está claro, aunque hay gran cantidad de estudios que la implican en la amiloidogénesis, bien actuando como chaperona que facilitaría la agregación del péptido Aβ, bien como proteína capaz de capturar el péptido impidiendo su agregación (revisión en <sup>48,49</sup>). También se postula que ApoE puede actuar protegiendo a las neuronas del daño oxidativo propio del envejecimiento, de una forma menos eficiente cuando la isoforma es ApoE4 <sup>50</sup>. Otros estudios sugieren que la implicación de ApoE en la patogenia puede estar mediada por su interacción con la proteína del citoesqueleto tau, principal componente de los ovillos neurofibrilares <sup>51</sup>. Se pueden encontrar varias revisiones recientes sobre funciones de la ApoE en relación con la EA, aunque no está claramente determinado cuál o cuáles de ellas son relevantes (ver por ejemplo <sup>52-54</sup> ). Independientemente del mecanismo, todos los indicios apuntan a que ApoE no sería causante de la EA, sino que su principal acción sería modificar el curso de la misma, dependiendo de la forma alélica y de la dosis <sup>55</sup>.



En 1998, según la hipótesis de que si ApoE era importante en la patogenia de la EA, también debían serlo sus niveles, nuestro equipo, tras una exploración de la región promotora del gen, describió la existencia de polimorfismos en esta región, que alteraban la actividad transcripcional del gen en células en cultivo y producían susceptibilidad para la EA <sup>56-58</sup>, aportando la evidencia, novedosa en el campo de la EA, de que los niveles alterados de una proteína pueden ser relevantes en la patogenia. Posteriormente se ha comprobado que, en humanos, los polimorfismos del promotor APOE están asociados con variaciones en la cantidad de la proteína en plasma y en cerebro <sup>46,59</sup>. Al igual que con los demás polimorfismos candidatos a excepción de apoE4, los estudios para confirmar la implicación de los polimorfismos en el promotor de APOE han dado lugar a resultados contradictorios <sup>46,60</sup>, aunque se siguen acumulando datos que muestran la importancia de la cantidad de ApoE en modelos animales <sup>61</sup> y en el cerebro de pacientes <sup>62</sup>.

Desde su descubrimiento, se hizo evidente que apoE4 no es necesaria ni suficiente para desarrollar la EA. Se estima, según las diferentes poblaciones y métodos de cálculo, que ApoE4 podría dar cuenta de entre un 10 y un 50% de los casos de EA compleja, siendo el resto de los casos debidos a otros genes o factores no genéticos.

## 2.2.- Otros genes ligados o asociados con la EA

Kehoe et al. <sup>63</sup>, tras estudiar 292 pares de hermanos con EA de aparición tardía, identificaron 16 *loci* ligados a la enfermedad en los cromosomas 1 (dos loci), 2, 5, 6, 9 (dos loci), 10 (dos loci), 12, 13, 14, 19 (un loci atribuible al gen APOE), 21 y X (dos loci), demostrando que hay varios genes implicados en EA. Con anterioridad, Pericak-Vance et al. <sup>64</sup> identificaron cuatro regiones posiblemente ligadas a la EA en los cromosomas 4, 6, 12 y 20. Se han identificado hasta un total de 22 regiones en los diversos estudios de este tipo. Actualmente los indicios más fuertes apuntan a la existencia de uno o más loci de susceptibilidad en los cromosomas 12 <sup>65,66</sup> y 10 <sup>67,68</sup>; parece que los genes responsables del ligamiento con el cromosoma 10 actúan modificando la cantidad del péptido Aβ de 42-43 aa <sup>69</sup>.

Por otra parte, en la última década se han desarrollado numerosos estudios de asociación (caso-control) de polimorfismos en genes candidatos con la EA. La mayoría de estos estudios se han basado en hipótesis patogénicas: así, se han analizado genes de proteasas que podrían participar en la proteólisis del APP, genes relacionados con la inflamación, con la apoptosis, neurotransmisores, etc. Se puede encontrar un listado de estos genes candidatos clasificados por funciones en la página Web <http://www.alzforum.org>. Hasta el momento se han asociado con la EA polimorfismos en unos cuarenta genes aunque ninguno de ellos se ha confirmado universalmente. Ni siquiera ApoE4, que es el factor genético más claramente establecido, se ha confirmado en todos los grupos étnicos: El apoE4 no es factor de riesgo en los negros nigerianos en los que la frecuencia del alelo en la población general es del 26% <sup>70</sup>, ni en los "amish" norteamericanos en los que la frecuencia es de 3.7% <sup>71</sup>.

Utilizando otra aproximación experimental, consistente en considerar la variación en la edad de inicio de la enfermedad de Alzheimer compleja como un carácter cuantitativo, Daw et al. <sup>72</sup> encuentran que hay al menos cuatro genes (o caracteres hereditarios) que contribuyen a la variación en la edad de inicio de la enfermedad tanto o más que el propio APOE. De estos, uno parece sustancialmente mayor que el resto, siendo responsable de más del 50% de la varianza genética. Los otros caracteres cuantitativos eran responsables de aproximadamente un 13%, 8% y 5%, respectivamente de la varianza genética, mientras que el APOE lo era del 7-9%.

En resumen, aunque sólo APOE está confirmado como gen de susceptibilidad para la EA, es evidente que hay otros factores genéticos, cuya identidad y efectos cuantitativos están aún por determinar, y que su conocimiento es necesario para



delinear la etiopatogénesis de la EA compleja.

### **2.3.- Complejidad en la EA no genética: Interacciones y módulos funcionales**

La comprensión de la etiopatogenia de la forma compleja de la EA requiere el estudio de las interacciones entre factores genéticos y no genéticos causantes en potencia de la enfermedad, así como con otros genes y factores no genéticos moduladores del riesgo. Se han descrito diversas interacciones genéticas en relación con la EA, algunas detectadas por nuestro equipo en una muestra caso control de pacientes españoles: interacción con la edad <sup>73</sup>, con el sexo <sup>74</sup>, entre polimorfismos en la región codificante y reguladora del gen APOE <sup>46</sup> e interacción intergénica, como la observada entre APOE y tau <sup>75</sup>. Hay más ejemplos de interacciones genéticas, como las de los genes de la butiril colinesterasa con ApoE4 <sup>76</sup> o ciertos haplotipos de genes mitocondriales con ApoE 4 <sup>77</sup>, que como en el caso de los genes individuales están a la espera de confirmación. La información que pueden aportar estas interacciones es de gran interés para delimitar rutas funcionales alteradas en EA. La existencia de interacciones queda patente en el estudio publicado recientemente por A. Brookes y cols. <sup>78</sup>, en el que analizan sesenta polimorfismos en un estudio caso control de EA presenil.

Las funciones celulares se llevan a cabo por conjuntos de moléculas que interaccionan entre sí, pudiendo considerarse cada uno de estos conjuntos como un módulo funcional. La mayoría de las propiedades funcionales de un módulo son propiedades colectivas, resultantes de las propiedades de sus componentes y de las interacciones entre ellos. En patología molecular, y más en el caso de las enfermedades complejas como la EA, se deben estudiar, por tanto, no sólo la relación de un gen con una determinada enfermedad, sino la relación de diferentes módulos funcionales con la misma.

En la EA, el aclaramiento de Aβ sirve como ejemplo de módulo funcional: parece que en este proceso intervienen ApoE, α-2 macroglobulina y el receptor de ambas, la LRP <sup>79</sup>. Si este módulo funcional es relevante en la etiopatogenia de la EA, se podrán detectar interacciones genéticas entre ellos; esto es, analizando el riesgo asociado a polimorfismos en estos tres genes, observaremos que el efecto de cada uno sobre el riesgo depende de la forma alélica del resto. La principal limitación de esta aproximación se debe a que un resultado negativo tendría múltiples explicaciones: que no existe interacción y por tanto que las proteínas en estudio no forman un módulo, que existen funciones redundantes, como que el ApoE utilice otro receptor además del LRP, o que la función que estamos estudiando no sea relevante. Un resultado positivo supondría una indicación de que esa función es realmente relevante en la patogenia de la EA.

Esta aproximación experimental está iniciándose en estos momentos, facilitada por las tecnologías genómicas y genéticas de alto rendimiento (arrays de DNA, genotipación automatizada, etc.).

### **3.- PERSPECTIVAS DE FUTURO.**

La investigación genética de la EA ha identificado elementos clave que son importantes para el conocimiento de la etiopatogenia de la enfermedad, aunque aún existe un vacío considerable para poder explicar adecuadamente cómo todos estos elementos interaccionan entre sí. La relación entre la herencia de las mutaciones en el gen APP y la EA familiar de inicio temprano ha situado también a la molécula del péptido Aβ en el eje central de la mayoría de los modelos de inicio tardío de la enfermedad, aunque todavía no está suficientemente aclarado cómo dicho péptido va produciéndose en cantidad considerable a lo largo de la vida en el cerebro y cómo podría llegar a causar problemas en la ancianidad. Posiblemente, la respuesta tenga que ver con la capacidad para reparar y reponer sistemas durante el envejecimiento



y la acumulación concomitante de otras sustancias, aparte del péptido A $\beta$ , que reduzcan las defensas contra el estrés oxidativo. <sup>47</sup>.

El hecho de que mutaciones en APP y PSEN1 y PSEN2 no causen el fenotipo de la enfermedad en las etapas muy iniciales de la vida sugiere que deben existir dos tipos de factores requeridos para el desarrollo de la enfermedad: unos, específicos, que incluirían a las mutaciones que afectan a la síntesis del péptido A $\beta$  y favorecen su forma amiloidogénica y otros, no específicos, que podrían incluir al genotipo APOE, que en última instancia va a influir en la pérdida de la homeostasis a medida que avanza el envejecimiento. Así pues, otro aspecto muy importante de los estudios genéticos es el diseño de protocolos terapéuticos en pacientes con EA. Dada la heterogeneidad genética de la enfermedad podría suponerse también una heterogeneidad en los patrones de respuesta terapéutica. En este contexto se sitúa la evidencia, aun por confirmar de forma definitiva, de que ciertos genotipos APOE tienen diferente respuesta terapéutica a los fármacos inhibidores de la acetilcolinesterasa.

En este sentido, la denominada "farmacogenética" puede ser de gran importancia en la identificación de genes importantes para el desarrollo de tratamientos "personalizados" atendiendo al genotipo de cada paciente. La construcción de un mapa de alta densidad de SNPs del genoma humano y el análisis de poblaciones de pacientes bien fenotipados podrá llevar a la identificación de nuevos factores de riesgo o de combinaciones de los mismos para el desarrollo de la EA. Igualmente, la disponibilidad de nuevas herramientas de análisis global de expresión génica ("cDNA arrays", chips de DNA, etc.) podrían ser útiles para la detección de genes candidatos que se expresan diferencialmente en los pacientes. Las nuevas metodologías proteómicas ayudarán a conocer mejor las funciones celulares de las proteínas implicadas en los mecanismos patogénicos de la EA.

#### 4.- CONCLUSIONES

La etiología de la EA sigue siendo desconocida, aunque hay evidencias de numerosas funciones alteradas. La genética, además de sus posibles aplicaciones clínicas en los casos de EA monogénica, es una poderosa herramienta para el estudio de los mecanismos patogénicos de la EA esporádica, especialmente si se usa en combinación con las modernas tecnologías genómicas y proteómicas. Se espera que estas metodologías, que están produciendo una cantidad enorme de información, ayuden a elaborar un cuadro más claro de cuáles son las alteraciones importantes, y cuándo y dónde se producen dichas alteraciones.

**Mutaciones causantes de EA monogénica.** La gran mayoría de los casos de EA autosómica dominante están causados por mutaciones en la PSEN1, en cuya región codificante se han descrito más de 80 mutaciones. Las mutaciones en APP y PSEN2 son escasas, situándose las de APP cerca de los sitios de corte de las secretasas (figura1) y las de PSEN2 en sus regiones homólogas con PSEN1. Todas las mutaciones patogénicas de la PSEN1, así como las de APP y PSEN2, ensayadas en modelos celulares o animales provocan un aumento en la producción del péptido A $\beta$ , o un desbalance entre las formas largas de 42/43 aa, más amiloidogénicas, y la de 40 aa, menos amiloidogénica <sup>80, 81</sup>. Aunque todos estos datos apuntan al amiloide como una molécula fundamental en la patogénesis de la EA monogénica, queda por aclarar cuál es la secuencia de acontecimientos que ligan la amiloidogénesis con la neurodegeneración "in vivo".

**Genética de la EA esporádica.** Los estudios genéticos no son aun aplicables a la clínica en la forma esporádica de la EA, como para otras enfermedades de etiología compleja; sin embargo, no hay ninguna duda sobre su papel fundamental para la investigación básica y para el desarrollo de estrategias terapéuticas por la industria farmacéutica. En primer lugar, será necesario conocer el mayor número posible de

factores genéticos y ambientales que intervienen en la etiología de la EA para establecer las combinaciones de factores causales, genéticos y ambientales, que determinan la variación en el riesgo de enfermedad en determinados grupos de individuos, familias o poblaciones. Este tipo de estudios necesitan disponer de muestras muy numerosas; de hecho, y dado que la tecnología para el estudio de polimorfismos está muy avanzada, el tamaño muestral supone la principal limitación para los estudios epidemiológicos. Se prevé que los avances tecnológicos en genómica (microarrays de expresión, modelos celulares y ratones transgénicos...), proteómica (análisis masivos de proteínas por espectrometría de masas...), y genética (mapas de alta densidad de SNPs (<http://www.hgvs.org> ; <http://snp.cshl.org> ) y genotipificación de alto rendimiento <sup>82</sup>), que permiten obtener una cantidad enorme de información en un tiempo muy corto <sup>83</sup>, permitirán en los próximos años ordenar la multitud de datos desconectados que conocemos en la actualidad y delimitar la jerarquía de actuación de los diferentes factores implicados.

## 5.- TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Factores genéticos en la Enfermedad de Alzheimer (EA)

- Mutaciones que explican los casos de EA familiar de comienzo temprano. (1 5 % de casos)
  - Gen de la Proteína Precursora de Amiloide (APP; OMIM \*104760) (Cromosoma 21)
  - Gen de la Presenilina 1 (PSEN1; OMIM \*104311) (Cromosoma 14)
  - Gen de la Presenilina 2 (PSEN2; OMIM \*600759) (Cromosoma 1)
- Polimorfismos (variantes genéticas) que pueden incrementar la susceptibilidad de padecer enfermedad de Alzheimer esporádica (90-95% de todos los casos).
  - Confirmado:
    - Alelo ε4 del gen de la Apolipoproteína E (APOE) (Cromosoma 19)
  - No confirmados universalmente (resultados variables en los estudios de réplica):
    - Gen de la  $\alpha$ -2 macroglobulina
    - Gen del receptor de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)
    - Gen de la  $\alpha$ -1 antitripsina
    - Gen de butirilcolinesterasa K
    - Gen de Ubiquitina
    - Gen de la proteína tau
    - Genes mitocondriales (Citocromo-oxidasas I y II)
    - Genes de las interleucinas 1A y 1B.
    - Otros, hasta unos cincuenta genes

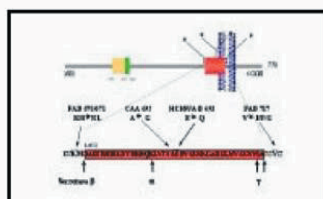
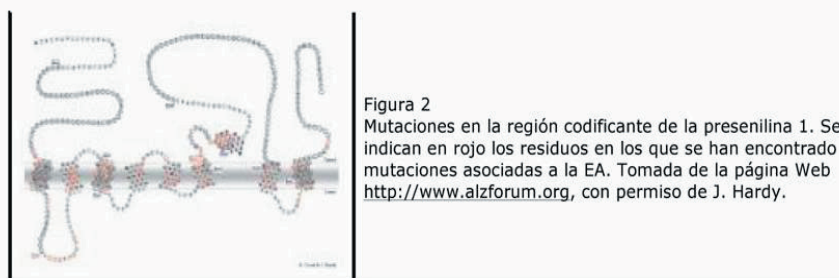


Figura 1  
Algunas de las mutaciones del APP causantes de EA. Se observa que todas las mutaciones estén localizadas en o muy cerca de los sitios de corte de las secretasas. Se puede encontrar una lista exhaustiva de mutaciones en la Web <http://www.alzforum.org>.





## BIBLIOGRAFÍA

1. Aldudo, J., Bullido, M.J. & Valdivieso, F. DGGE method for the mutational analysis of the coding and proximal promoter regions of the Alzheimer's disease presenilin-1 gene: two novel mutations. *Hum Mutat* 14, 433-9 (1999).
2. Theuns, J. & Van Broeckhoven, C. Transcriptional regulation of Alzheimer's disease genes: implications for susceptibility. *Hum Mol Genet* 9, 2383-94. (2000).
3. Glenner, G.G. & Wong, C.W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120, 885-90. (1984).
4. Glenner, G.G. & Wong, C.W. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun* 122, 1131-5. (1984).
5. Kang, J. et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733-6. (1987).
6. Goldgaber, D., Lerman, M.I., McBride, O.W., Saffiotti, U. & Gajdusek, D.C. Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* 235, 877-80. (1987).
7. Robakis, N.K. et al. Chromosome 21q21 sublocalisation of gene encoding beta-amyloid peptide in cerebral vessels and neuritic (senile) plaques of people with Alzheimer disease and Down syndrome. *Lancet* 1, 384-5. (1987).
8. Tanzi, R.E. et al. Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 235, 880-4. (1987).
9. Goate, A. et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease [see comments]. *Nature* 349, 704-6 (1991).
10. Hardy, J., Duff, K., Hardy, K.G., Perez-Tur, J. & Hutton, M. Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. *Nat Neurosci* 1, 355-8. (1998).
11. Huse, J.T. & Doms, R.W. Closing in on the amyloid cascade: recent insights into the cell biology of Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 22, 81-98. (2000).
12. Schellenberg, G.D. et al. Absence of linkage of chromosome 21q21 markers to familial Alzheimer's disease. *Science* 241, 1507-10. (1988).
13. St George-Hyslop, P.H. et al. Genetic linkage studies suggest that Alzheimer's disease is not a single homogeneous disorder. FAD Collaborative Study Group. *Nature* 347, 194-7. (1990).
14. Weitkamp, L.R., Nee, L., Keats, B., Polinsky, R.J. & Guttormsen, S. Alzheimer disease: evidence for susceptibility loci on chromosomes 6 and 14. *Am J Hum Genet* 35, 443-53. (1983).
15. Schellenberg, G.D. et al. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 258, 668-71. (1992).
16. St George-Hyslop, P. et al. Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Nat Genet* 2, 330-4. (1992).
17. Mullan, M. et al. A locus for familial early-onset Alzheimer's disease on the long arm of chromosome 14, proximal to the alpha 1-antichymotrypsin gene. *Nat Genet* 2, 340-2. (1992).
18. Van Broeckhoven, C. et al. Mapping of a gene predisposing to early-onset Alzheimer's disease to chromosome 14q24.3. *Nat Genet* 2, 335-9. (1992).



19. Sherrington, R. et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754-60. (1995).
20. van Duijn, C.M. et al. Genetic association of the presenilin-1 regulatory region with early-onset Alzheimer's disease in a population-based sample. *Eur J Hum Genet* 7, 801-6. (1999).
21. Aldudo, J., Bullido, M.J., Frank, A. & Valdivieso, F. Missense mutation E318G of the presenilin-1 gene appears to be a nonpathogenic polymorphism. *Ann Neurol* 44, 985-6. (1998).
22. Mattila, K.M. et al. The Glu318Gly mutation of the presenilin-1 gene does not necessarily cause Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 44, 965-7. (1998).
23. Cruts, M. & Van Broeckhoven, C. Presenilin mutations in Alzheimer's disease. *Hum Mutat* 11, 183-90 (1998).
24. Rogaev, E.I. et al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376, 775-8. (1995).
25. Levy-Lahad, E. et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269, 973-7. (1995).
26. Selkoe, D.J. Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease. *Annu Rev Cell Biol* 10, 373-403 (1994).
27. Selkoe, D.J. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 399, A23-31. (1999).
28. Mattson, M.P., Guo, Q., Furukawa, K. & Pedersen, W.A. Presenilins, the endoplasmic reticulum, and neuronal apoptosis in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 70, 1-14. (1998).
29. Li, X. & Greenwald, I. Additional evidence for an eight-transmembrane-domain topology for *Caenorhabditis elegans* and human presenilins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7109-14. (1998).
30. Selkoe, D.J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81, 741-66. (2001).
31. Li, Y.M. et al. Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6138-43. (2000).
32. Selkoe, D.J. & Wolfe, M.S. In search of gamma-secretase: presenilin at the cutting edge. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5690-2. (2000).
33. Wolfe, M.S. Presenilin and gamma-secretase: structure meets function. *J Neurochem* 76, 1615-20. (2001).
34. Haass, C. & De Strooper, B. The presenilins in Alzheimer's disease--proteolysis holds the key. *Science* 286, 916-9. (1999).
35. Struhl, G. & Greenwald, I. Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature* 398, 522-5. (1999).
36. Ye, Y., Lukinova, N. & Fortini, M.E. Neurogenic phenotypes and altered Notch processing in *Drosophila* Presenilin mutants. *Nature* 398, 525-9. (1999).
37. Selkoe, D.J. Notch and presenilins in vertebrates and invertebrates: implications for neuronal development and degeneration. *Curr Opin Neurobiol* 10, 50-7. (2000).
38. Kulic, L. et al. Separation of presenilin function in amyloid beta-peptide generation and endoproteolysis of Notch. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5913-8. (2000).
39. Pericak-Vance, M.A. et al. Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Hum Genet* 48, 1034-50. (1991).
40. Strittmatter, W.J. et al. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1977-81. (1993).
41. Corder, E.H. et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921-3. (1993).
42. Mahley, R.W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240, 622-30. (1988).
43. Weisgraber, K.H. Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv Protein Chem* 45, 249-302 (1994).
44. Poirier, J. Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 17, 525-30. (1994).



45. Xu, P.T. et al. Regionally specific neuronal expression of human APOE gene in transgenic mice. *Neurosci Lett* 246, 65-8. (1998).
46. Bullido, M.J. & Valdivieso, F. Apolipoprotein E gene promoter polymorphisms in Alzheimer's disease. *Microsc Res Tech* 50, 261-7. (2000).
47. Tandon, A., Rogaeva, E., Mullan, M. & St George-Hyslop, P.H. Molecular genetics of Alzheimer's disease: the role of beta-amyloid and the presenilins. *Curr Opin Neurol* 13, 377-84. (2000).
48. Tomiyama, T., Corder, E.H. & Mori, H. Molecular pathogenesis of apolipoprotein E-mediated amyloidosis in late-onset Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci* 56, 268-79. (1999).
49. Poirier, J. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. A role in amyloid catabolism. *Ann N Y Acad Sci* 924, 81-90 (2000).
50. Miyata, M. & Smith, J.D. Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nat Genet* 14, 55-61. (1996).
51. Lovestone, S. et al. Apolipoprotein E gene and Alzheimer's disease: is tau the link? *Biochem Soc Symp* 67, 111-20 (2001).
52. Mahley, R.W., Nathan, B.P. & Pitas, R.E. Apolipoprotein E. Structure, function, and possible roles in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 777, 139-45. (1996).
53. Baum, L., Chen, L., Ng, H.K. & Pang, C.P. Apolipoprotein E isoforms in Alzheimer's disease pathology and etiology. *Microsc Res Tech* 50, 278-81. (2000).
54. Saunders, A.M. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: an update on genetic and functional analyses. *J Neuropathol Exp Neurol* 59, 751-8. (2000).
55. Meyer, M.R. et al. APOE genotype predicts when--not whether--one is predisposed to develop Alzheimer disease. *Nat Genet* 19, 321-2. (1998).
56. Artiga, M.J. et al. Risk for Alzheimer's disease correlates with transcriptional activity of the APOE gene. *Hum Mol Genet* 7, 1887-92. (1998).
57. Artiga, M.J. et al. Allelic polymorphisms in the transcriptional regulatory region of apolipoprotein E gene. *FEBS Lett* 421, 105-8. (1998).
58. Bullido, M.J. et al. A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia. *Nat Genet* 18, 69-71. (1998).
59. Scacchi, R. et al. Polymorphisms of the apolipoprotein E gene regulatory region and of the LDL receptor gene in late-onset Alzheimer's disease in relation to the plasma lipidic pattern. *Dement Geriatr Cogn Disord* 12, 63-8. (2001).
60. Wang, J.C., Kwon, J.M., Shah, P., Morris, J.C. & Goate, A. Effect of APOE genotype and promoter polymorphism on risk of Alzheimer's disease. *Neurology* 55, 1644-9. (2000).
61. Holtzman, D.M. et al. Expression of human apolipoprotein E reduces amyloid-beta deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Clin Invest* 103, R15-R21. (1999).
62. Berr, C. et al. Neuropathological epidemiology of cerebral aging: a study of two genetic polymorphisms. *Neurobiol Aging* 22, 227-35. (2001).
63. Kehoe, P. et al. A full genome scan for late onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 8, 237-45. (1999).
64. Pericak-Vance, M.A. et al. Complete genomic screen in late-onset familial Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 19, S39-42. (1998).
65. Scott, W.K. et al. Fine mapping of the chromosome 12 late-onset Alzheimer disease locus: potential genetic and phenotypic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 66, 922-32. (2000).
66. Wu, W.S. et al. Genetic studies on chromosome 12 in late-onset Alzheimer disease. *Jama* 280, 619-22. (1998).
67. Myers, A. et al. Susceptibility locus for Alzheimer's disease on chromosome 10. *Science* 290, 2304-5. (2000).
68. Bertram, L. et al. Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q. *Science* 290, 2302-3. (2000).
69. Ertekin-Taner, N. et al. Linkage of plasma Abeta42 to a quantitative locus on chromosome 10 in late-onset Alzheimer's disease pedigrees. *Science* 290, 2303-4. (2000).
70. Sayi, J.G. et al. Apolipoprotein E polymorphism in elderly east Africans. *East Afr*

- Med J 74, 668-70. (1997).
71. Pericak-Vance, M.A. et al. Alzheimer's disease and apolipoprotein E-4 allele in an Amish population. *Ann Neurol* 39, 700-4. (1996).
72. Daw, E.W. et al. The number of trait loci in late-onset alzheimer disease [In Process Citation]. *Am J Hum Genet* 66, 196-204 (2000).
73. Farrer, L.A. et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium [see comments]. *Jama* 278, 1349-56 (1997).
74. Bullido, M.J. et al. Alzheimer's risk associated with human apolipoprotein E, alpha-2 macroglobulin and lipoprotein receptor related protein polymorphisms: absence of genetic interactions, and modulation by gender. *Neurosci Lett* 289, 213-6. (2000).
75. Bullido, M.J. et al. A polymorphism in the tau gene associated with risk for Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 278, 49-52. (2000).
76. Mattila, K.M. et al. Dipeptidyl carboxypeptidase 1 (DCP1) and butyrylcholinesterase (BChE) gene interactions with the apolipoprotein E epsilon4 allele as risk factors in Alzheimer's disease and in Parkinson's disease with coexisting Alzheimer pathology. *J Med Genet* 37, 766-70. (2000).
77. Carrieri, G. et al. Mitochondrial DNA haplogroups and APOE4 allele are non-independent variables in sporadic Alzheimer's disease. *Hum Genet* 108, 194-8. (2001).
78. Emahazion, T. et al. SNP association studies in Alzheimer's disease highlight problems for complex disease analysis. *Trends Genet* 17, 407-13. (2001).
79. Blacker, D. et al. Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease [see comments]. *Nat Genet* 19, 357-60 (1998).
80. Chapman, P.F., Falinska, A.M., Knevet, S.G. & Ramsay, M.F. Genes, models and Alzheimer's disease. *Trends Genet* 17, 254-61. (2001).
81. van Leuven, F. Single and multiple transgenic mice as models for Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 61, 305-12. (2000).
82. Gut, I.G. Automation in genotyping of single nucleotide polymorphisms. *Hum Mutat* 17, 475-92. (2001).
83. Sander, C. Genomic medicine and the future of health care. *Science* 287, 1977-8. (2000).

**Ana Martínez García y María J. Bullido**

*Departamento de Biología Molecular y Centro de Biología  
Molecular Severo Ochoa (C.S.I.C.-U.A.M.)  
Universidad Autónoma de Madrid*

---

## ANEXO II-B

---







## SNP genotyping with FRET probes. Optimizing the resolution of heterozygotes

A. Martínez-García, I. Sastre, R. Tenorio, M.J. Bullido\*

*Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa'-CSIC, Facultad de Ciencias Lab. CX-340, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid 28049, Spain*

Received 18 August 2003; accepted for publication 12 March 2004

### Abstract

Analysis of single nucleotide polymorphisms by PCR with fluorescence resonance energy transfer (FRET) probes often can produce a result where the melting peak corresponding to perfectly matched sequence (A allele) has a smaller area than the peak corresponding to the allele with a mismatch (B allele). This imbalance can make it difficult to distinguish heterozygous individuals from BB homozygotes. These results suggested that the higher strength in the binding of the perfect match probe to the A allele could cause the selective amplification of the B allele, possibly by interfering with the elongation of the PCR product. In order to optimize the detection of heterozygotes in allelic discrimination assays with FRET probes, we tested several modifications aimed at minimizing the apparent interference of the probes with the amplification process. We observed, in agreement with our hypothesis, that lowering the probe concentration or adding the probes after the amplification step more accurately resolved heterozygotes.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Single nucleotide polymorphism; fluorescence resonance energy transfer probes; Real time PCR; Heterozygote; Allelic discrimination

### 1. Introduction

In comparison with more traditional methods such as RFLP, real time PCR in the presence of fluorescence resonance energy transfer (FRET) probes is a fast, simple and accurate procedure [1] for single nucleotide polymorphisms (SNP) genotyping of medium to large collections of samples such as the ones used to perform genetic association studies. SNP genotyping with FRET probes is an end-point analysis of a PCR product, in which the melting profile of the product from two fluorescent probes (anchor and sensor) permits easy detection of the genotypes by the melting temperature ( $T_m$ ) of the sensor probe to the perfectly matched or mismatched allele [2,3].

We applied this technique to genotype SNPs in a human sample composed of hundreds of individuals. We found perfect discrimination of the homozygous individuals for all SNPs analysed under standard conditions. However, in the vast majority of the SNPs we observed poor resolution of heterozygotes for which the melting peak corresponding to

the allele perfectly matching the sensor probe (henceforth the 'A' allele) had a smaller area than the peak corresponding to the 'B' allele (the one bearing a mismatch with respect to the sensor probe). In some cases the difference was so great that we could scarcely distinguish the heterozygotes from the BB homozygotes. Consequently, we studied modifications of the standard genotyping protocol for FRET probes with a view to improving the resolution of heterozygotes.

### 2. Materials and methods

Assays were optimized for an SNP in the human TAP2 gene (dbSNP rs241447) referred hereafter as SNP-1. Real-time PCR was performed in a LightCycler rapid thermal cycler (Roche Diagnostics Ltd, Lewes, UK). The PCR was performed in a 10  $\mu$ l volume reaction containing the nucleotides, Taq polymerase and buffer included in the LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes (Roche Diagnostics Ltd, Lewes, UK). The reaction mixture was completed with the DNA template (10–50 ng),

\* Corresponding author. Tel.: +34-397-8471; fax: +34-397-4799.  
E-mail address: mjbullido@cbm.uam.es (M.J. Bullido).

the primers, the two fluorescent probes (labeled with fluorescein and LCRed 640 or LCRed 705, respectively), and  $MgCl_2$ .

The concentration of these reagents was optimized for each SNP. For SNP-1 (dbSNP rs241447), we used 0.8  $\mu M$  of each primer (upper: 5'TTCCTGTCTTTCTGAGGCACT; lower: 5'TCCTGGAGCACCAGGATCT), 0.1  $\mu M$  of each probe (sensor (G): 5' CGCGTGAAGTGCCTGCA-Fluoresceine; anchor: LCRed640-CCTGTGAGCAATCACCAGCACTGTGC) and 2.5 mM  $MgCl_2$ .

The standard PCR protocol, provided in the instruction manual with the LightCycler Master mix, consisted of a 10 min denaturation step at 95 °C, followed by the amplification step, consisting of 45 cycles of denaturing at 95 °C for 10 s, annealing at the appropriate temperature for 5–15 s and extension at 72 °C (number of base pairs/25 s), and final cooling at 40 °C for 30 s. The allelic discrimination consisted of post-PCR melting that included heating at 95 °C (0 s), incubating at 5 °C below the melting temperature of the amplicon with the mismatched sensor probe (30–60 s) and slow heating (0.1 °C/s) over the melting temperature of the amplicon with the matched sensor probe, with fluorescence recorded continuously at 640 or 705 nm.

Following the modifications described in Section 3, the optimized PCR protocol for SNP-1 consisted of 10 min incubation at 95 °C followed by 40–50 cycles of denaturing at 94 °C (20 s), annealing at 56 °C (20 s) and extension at 72 °C (15 s). Fluorescence was measured at the end of the annealing step in each cycle. Allelic discrimination was performed by post-PCR melting that included heating at 94 °C (2 min), cooling at 40 °C (2 min) and slow heating (0.1 °C/s) to 80 °C, with the fluorescence determined continuously at 640 nm. A melting temperature of 58 °C indicated the presence of an adenine (B allele) while a melting temperature of 65 °C showed the presence of a guanosine (A allele) in the polymorphic residue. We used

the same protocol, with minor modifications, for other SNPs but with the concentration of the primers and the annealing temperatures optimized for each assay.

### 3. Results and discussion

Resolution of heterozygotes was particularly poor for SNP-1, possibly because this SNP is located in a region that is very rich in GC pairs. In contrast, an SNP in MTHFR (rs180133) produced very good results (B/A melting peak area = 1 in the heterozygotes, data not shown) with the standard protocol.

For most assays, the imbalance of the areas corresponding to the A and B alleles showed selective amplification of the mismatched (B) allele. We found no cases where the A allele seemed to be favored. Since the binding of the A allele to the sensor probe is stronger than that of the B allele, this pointed to a possible interference of the probe with template amplification. We therefore decided to look for reaction conditions which, while permitting the hybridization of the sensor probe to its target at the end-point of the PCR, did not interfere with the amplification step.

**Effect of probe concentration.** Fig. 1 shows the effect of decreasing the anchor and sensor probe concentrations to 0.1  $\mu M$  (Fig. 1b), compared to the standard concentration (both probes at 0.2  $\mu M$ , Fig. 1a). Although the fluorescence of the products at the PCR end-point was lower for the probes at 0.1  $\mu M$  than at 0.2  $\mu M$ , there was a significant improvement in the heterozygote ratios. With the probes at 0.2  $\mu M$ , the peak area of the B allele was 5.2 times greater than that of the A allele (range from 4 to 20 times for different individuals). In contrast, with the probes at 0.1  $\mu M$  the peak area ratio was only 1.62 (B/A, range from 1.44 to 1.80 times). Furthermore, there were some individuals (Fig. 1b) for which it was not possible to assign a genotype with the probes at 0.2  $\mu M$  (Fig. 1a), but who were clearly

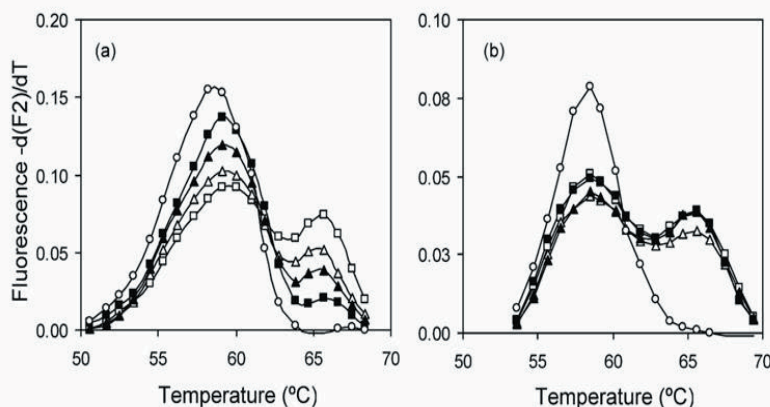


Fig. 1. Derivative melting curves of five different individuals genotyped for SNP-1 using the optimized protocol detailed in Section 2. (a) Curves of the PCR with probes at 0.2 M; (b) curves of the same samples with probes at 0.1 M. ○ is a BB homozygote.



Table 1  
Melting peak areas for two heterozygous human cell lines for SNP-1, genotyped by real time PCR with FRET probes

Probes		Cell line					
		Jurkat			AG09394		
		Allele B	Allele A	B/A ratio	Allele A	Allele B	B/A ratio
0.2 $\mu$ M	Peak area (a.u.)	0.55 $\pm$ 0.08	0.29 $\pm$ 0.04	2.02 $\pm$ 0.30	0.48 $\pm$ 0.07	0.26 $\pm$ 0.04	1.99 $\pm$ 0.31
	Melting temp ( $T_m$ , °C)	57.9 $\pm$ 0.4	64.9 $\pm$ 0.4		58.1 $\pm$ 0.4	65.1 $\pm$ 0.4	
0.1 $\mu$ M	Peak area	0.24 $\pm$ 0.06	0.11 $\pm$ 0.02	2.10 $\pm$ 0.26	0.20 $\pm$ 0.05	0.10 $\pm$ 0.01	1.81 $\pm$ 0.26
	$T_m$	57.8 $\pm$ 0.4	64.2 $\pm$ 0.2		58.0 $\pm$ 0.4	64.4 $\pm$ 0.2	
0.2 $\mu$ M post PCR	Peak Area	0.65 $\pm$ 0.12	0.72 $\pm$ 0.12	0.89 $\pm$ 0.04	0.69 $\pm$ 0.19	0.71 $\pm$ 0.17	0.88 $\pm$ 0.08
	$T_m$	57.7 $\pm$ 0.3	65.4 $\pm$ 0.2		57.2 $\pm$ 0.3	65.0 $\pm$ 0.3	

Effect of the presence or absence of probes during the amplification step. Probes were present at 0.2 or 0.1  $\mu$ M during the PCR, or added after the PCR at 0.2  $\mu$ M. Data shown are the mean ( $\pm$  standard error of the mean) of six independent experiments.

heterozygotes when analyzed with the probes at 0.1  $\mu$ M (Fig. 1b) or by RFLP (not shown). Since the DNAs in this study came from clinical specimens, we wondered whether this effect might be due to low template quality. To test this, we used DNA from several human cell lines with high concentration, purity and integrity. We observed that the phenomenon was also present with this high quality DNA. In fact, we found that in a few cases such as Jurkat or a human B lymphoblastoid cell line (N.I.A. Repository Code AG09394), lowering the probe concentration was not enough to yield a correct peak area proportion (see below).

*Effect of adding the probes after the amplification step.* Since the previous result suggested that the probes could be interfering with the amplification of the A allele, we next assayed the effect of adding the probes after the amplification step. As shown in Table 1, the heterozygote resolution was much better than when the probes were present during the amplification step, either at 0.2 or 0.1  $\mu$ M. Considering that this procedure greatly increases the handling required for genotyping, we decided that lowering the probe

concentrations was sufficient for our screening purposes. However, in some cases where this is not enough to yield good resolution the post-PCR addition of the probes could be valuable.

*Effect of incubation time prior to the melting step.* In the standard protocol for genotyping with FRET probes, post-PCR melting for the allelic identification of the products is preceded by a short preincubation (0 s at 95 °C and 30–60 s at 5 °C below the melting temperature of the probes from the B allele). As shown in Fig. 2a, we observed that fluorescence increased at the beginning of the melting process, suggesting that the hybridization of the probes on the template during the preincubation step was not complete. In order to resolve this we extended the post-PCR preincubation step to 4 min (94 °C for 2 min followed by 2 min at 50 °C). As illustrated in Fig. 2b, this slightly longer preincubation stabilized the fluorescence until the start of melting. This in turn produced a better separation of the melting zones corresponding to the B and the A alleles, facilitating the resolution of the heterozygotes.

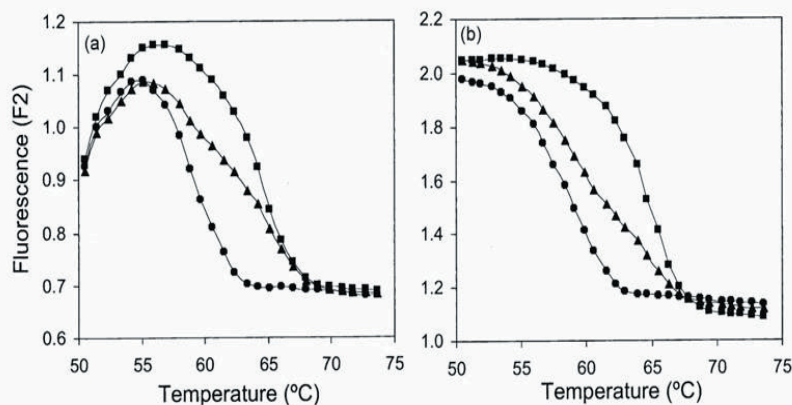


Fig. 2. Effect of preincubation between the PCR and the melting steps in SNP-1 genotyping. After 40 cycles of PCR, tubes were incubated at 94 °C and then at 50 °C for different times. (a) Melting curves after 5 s at 94 °C and 5 s at 50 °C, and (b) melting curves after a preincubation of 2 min at 94 °C followed by 2 min at 50 °C.



Table 2

Relative area of melting peaks for different SNPs in DNA samples of heterozygous individuals, genotyped by real time PCR with FRET probes

dbSNP reference	Gene symbol	Primers (μM)	Annealing temperature (°C)	Melt./anneal/ exten. time (s)	Allele B area	Allele A area	B/A ratio
rs3025786	PSEN1	1	50	20/20/20	0.34 ± 0.02	0.27 ± 0.03	1.36 ± 0.07
rs165932	TAP2	0.8	56	20/20/15	0.80 ± 0.16	0.44 ± 0.07	1.62 ± 0.18
rs1801131	MTHFR	0.6	57	15/15/15	0.28 ± 0.01	0.21 ± 0.01	1.32 ± 0.04
rs3208334	14-3-3 β	0.4	52	15/15/15	0.08 ± 0.007	0.06 ± 0.006	1.51 ± 0.11
rs2074734	PLA2G3	0.8	57	15/15/15	0.09 ± 0.008	0.10 ± 0.007	0.94 ± 0.09
rs2074735	PLA2G3	0.8	57	15/15/15	0.09 ± 0.003	0.09 ± 0.005	1.08 ± 0.06

Probes were present at 0.1 μM during the PCR, performed following the optimized protocol detailed in Section 2. Data shown are the mean (± standard error of the mean) of 20 different individuals for each SNP.

We also found some minor modifications to the standard protocol that may improve the detection of the product, regardless of the genotype, and/or the resolution of heterozygous samples. For example, performing the melting after a long incubation at 25 °C (overnight), at 4 °C (2–3 days), or after additional PCR cycles (20 or more), produced higher fluorescence and, in the heterozygous samples, a better ratio of the melting peaks (data not shown). By using some or all of the modifications described above, especially lowering the concentration of the probes to 0.1 μM and extending the incubation step between the amplification and the melting from 5 s to 4 min, we were able to genotype more than 600 DNA samples of varying quality for the SNPs shown in Table 2. In every case heterozygotes could be resolved as clearly as SNP rs1801131 in the MTHFR gene (Fig. 3).

In our experience, heterozygote discrimination is the major problem in PCR-based genotyping, not only with FRET probes but also in many other techniques ranging from RFLP to direct sequencing. The optimization of these methods is therefore of considerable interest. Furthermore, an accurate measurement of a given DNA variant in a mixture could be applicable to cases that are more complex than biallelic SNP genotyping in human genomic DNA. One such complex case is the genetic characterization of clinical pathogens [4,5] which are usually composed of different mixes of genetic variants. Accurate quantitation of

the variants present in such sample could be highly useful in the diagnosis and treatment of disease. Real-time PCR with FRET probes is, after careful adjustment of the reaction parameters, a useful tool for these screening purposes.

#### 4. Conclusions

The accurate discrimination of heterozygotes is the most problematic point of PCR-based SNP genotyping. In this study, we explored several modifications to the standard genotyping protocol by real time PCR with FRET probes. These modifications, especially those which limit the concentration of the hybridization probes during the amplification step, allowed more accurate and reproducible heterozygote detection in cases where the standard protocol did not provide sufficient resolution.

#### Acknowledgements

This study was funded by the Comunidad Autonoma de Madrid, the Obra Social Caja de Madrid, and by an institutional grant from the 'Ramón Areces' Foundation for the CBMSO. The work received the Roche Applied Science Award for LightCycler Applications (Spain, Second edition).

#### References

- [1] Bernard PS, Wittwer CT. Homogeneous amplification and variant detection by fluorescent hybridization probes. *Clin Chem* 2000;46: 147–8.
- [2] Bernard PS, Lay MJ, Wittwer CT. Integrated amplification and detection of the C677T point mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves. *Anal Biochem* 1998;255:101–7.
- [3] Hnatyszyn HJ, Podack ER, Young AK, Seivright R, Spruill G, Kraus G. The use of real-time PCR and fluorogenic probes for rapid and accurate genotyping of newborn mice. *Mol Cell Probes* 2001;15:16975.
- [4] Bullock GC, Bruns DE, Haverstick DM. Hepatitis C genotype determination by melting curve analysis with a single set of fluorescence resonance energy transfer probes. *Clin Chem* 2002;48:214754.
- [5] Patra G, Williams LE, Qi Y, Rose S, Redkar R, Delvecchio VG. Rapid genotyping of *Bacillus anthracis* strains by real-time polymerase chain reaction. *Ann N Y Acad Sci* 2002;969:10611.

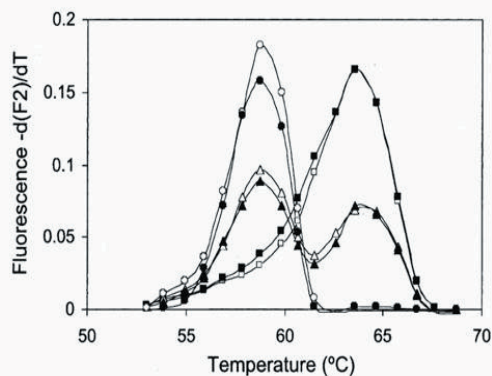


Fig. 3. Derivative melting curves for two individuals representative of each genotype (□ and ■ 'AA'; △ and ▲ 'AB'; ○ and ● 'BB') for the SNP rs1801131, using the optimized protocol described in Section 2.

---

ANEXO II-C

---





Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Neuroscience Letters 408 (2006) 203–208

Neuroscience  
Letters[www.elsevier.com/locate/neulet](http://www.elsevier.com/locate/neulet)

## Association of *DSCI*, a gene modulated by adrenergic stimulation, with Alzheimer's disease

María C. Ramos<sup>a,1</sup>, Raquel Tenorio<sup>a,1</sup>, Ana Martínez-García<sup>a,1</sup>, Isabel Sastre<sup>a</sup>,  
Elisabet Vilella-Cuadrada<sup>b</sup>, Ana Frank<sup>c</sup>, Marcel Rosich-Estragó<sup>d</sup>,  
Fernando Valdivieso<sup>a</sup>, María J. Bullido<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biología Molecular and Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (C.S.I.C.-U.A.M.), Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Unitat de Psiquiatria i Psicologia Mèdica, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, 43206 Reus (Tarragona), Spain

<sup>c</sup> Servicio de Neurología, Hospital Universitario La Paz (UAM), 28034 Madrid, Spain

<sup>d</sup> Hospital Psiquiàtric Universitari Institut Pere Mata (URV), 43206 Reus (Tarragona), Spain

Received 25 May 2006; received in revised form 26 July 2006; accepted 1 September 2006

### Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a complex multifactorial disorder involving a number of genetic and environmental factors, with severe head injury consistently reported as a major non-genetic risk factor. The adrenergic activation that occurs during major trauma increases cAMP levels, therefore the cAMP signaling pathway might be involved in AD pathogenesis. Time course of candidate gene expression following adrenergic stimulation with isoproterenol was assayed in neuroblastoma cells by quantitative reverse transcription (RT)-PCR. Then, genetic association studies of polymorphisms in several of these candidate genes were performed. Association studies in two independent case-control samples showed a polymorphism in *DSCI*, encoding desmocollin 1 – a member of the desmosomal cadherins – which modulated AD susceptibility in a gender-specific manner. These results are in accordance with the potential involvement of the adrenergic signaling pathway in AD pathogenesis.

© 2006 Published by Elsevier Ireland Ltd.

**Keywords:** Alzheimer's disease; Adrenergic system; *DSCI* polymorphism; Gender

The  $\epsilon 4$  allele of apolipoprotein E (*APOE4*) is the main genetic risk factor for Alzheimer's disease (AD) [4,8], although other genes and environmental factors are also involved in AD susceptibility [4]. Head injury, the major AD non-genetic risk factor [9,11,14], induces the release of catecholamines [22] triggering the adrenergic system, although it remains controversial whether this activation is a rescue event or contributes to the neurodegeneration. The binding of catecholamines to their receptors activates several signaling pathways via the interaction of these receptors with heterotrimeric G proteins. Although the signaling cascades also include cAMP-independent pathways [13], the main effect of agonist binding to adrenergic receptors is the activation of adenylyl cyclase, which induces an increase in cellular cAMP levels [19]. This triggers a sig-

naling pathway activating cAMP-dependent protein kinase A, which in turn activates several transcription factors. The next step in the pathway involves transcription and de novo protein synthesis.

The stimulation of adenylyl cyclase in the hippocampus is critical for memory formation and long-term potentiation [30] as well as for neural regeneration [31]. These functions are probably mediated by cAMP (which controls the cell cycle and cell proliferation) [27], although the downstream effectors of these systems are still unknown.

We recently reported polymorphisms in genes involved in adrenergic signaling associated with AD, with the risk positively correlating with cell responsiveness to adrenergic stimulation [6].

These evidences strongly suggest that adrenergic signaling may be involved in AD pathogenesis. The present work investigates this possibility by examining a collection of genes whose expression, determined in an Affimetrix U133 microarray, varied significantly following the stimulation of adrenergic receptors

\* Corresponding author. Tel.: +34 1 497 8415; fax: +34 1 4974799.

E-mail address: [mjbullido@cbm.uam.es](mailto:mjbullido@cbm.uam.es) (M.J. Bullido).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.



and/or the direct activation of adenylyl cyclase in a human neuroblastoma cell line (unpublished results).

Since these genes respond to adrenergic stimulation, they are candidates for carrying polymorphic variants that influence cell responsiveness to adrenergic stress and, therefore, for modulating AD susceptibility. To test this, a genetic association study with single nucleotide polymorphisms (SNPs) was performed, and a polymorphism in desmocollin 1 (*DSCI*) gene was found to be associated with AD in a gender-modulated manner.

SK-N-MC cells (ATCC; Ref. HTB-10) were grown in modified Eagle's medium (MEM) with 10% fetal bovine serum and 100 µg/ml gentamicin in a humidified atmosphere with 7.5% CO<sub>2</sub> at 37 °C.

SK-N-MC cells were cultured in a 6-well/plate ( $6 \times 10^5$  cells/well) for 24 h and treated with 10 µM isoproterenol or vehicle (200 µM HEPES [pH 7.4] and 10 µM ascorbic acid) for 12, 24 or 36 h; where indicated, cells were treated with 10 µM of forskolin in the same conditions as above. The cAMP levels were then measured as previously described [18] and normalized in terms of protein quantity.

The mRNA content of each gene was quantified by two-step reverse transcription (RT)-PCR using Taqman low density arrays (Applied Biosystems). Total RNA isolated with Tripure (Boehringer) from SK-N-MC cells was subjected (1 µg RNA in 100 µl reaction volume) to reverse transcription using the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). Real-time PCR was then performed in the Taqman arrays. Briefly, cDNA was mixed with TaqMan Universal PCR Master Mix NoAmpEraseUNG (Applied Biosystems) and applied to the array (5 µl of the RT reaction in 100 µl reaction volume per port). PCR (94.5 °C for 10 min plus 40 cycles of 97 °C for 30 s and 59.7 °C for 1 min) was performed in an ABI 7900HT machine (Applied Biosystems). The relative quantity was determined by the  $\Delta\Delta C_t$  method using SDS v2.1.1 software; *GAPDH* was the housekeeping gene since its expression did not change at any of the experimental points.

The test sample consisted of 241 sporadic AD patients (mean age at onset  $71.0 \pm 10.6$  years; 61% females) and 312 controls (age at examination  $73.3 \pm 12.8$  years; 60% females) from central Spain (Madrid), recruited at the neurology departments of the participating hospitals. The patients had a diagnosis of probable AD according to the NINCDS-ADRDA [20] or DSM-IV [32] criteria for Alzheimer's dementia. The cognitive status of the controls was measured by the Mini Mental Test. This sample had previously been genotyped for *APOE* and other polymorphic genes [6].

The contrast sample, from north-east Spain (Catalonia), consisted of 339 sporadic AD patients ( $74.9 \pm 6.0$  years; 71% females) plus 220 healthy controls ( $71.2 \pm 8.3$  years; 53% females). The patients had a diagnosis of probable AD according to the NINCDS-ADRDA [20] and DSM-IV [32] criteria for Alzheimer's dementia. The cognitive status of the controls was measured by the Mini Mental, MEC and WAIS Cubes tests. This sample has previously been genotyped for *APOE* and described in detail [25].

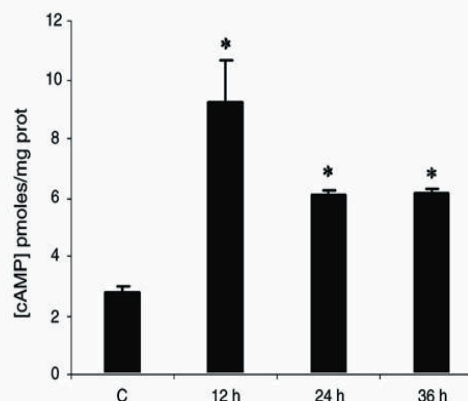


Fig. 1. Isoproterenol-induced cAMP increase in neuroblastoma cells. cAMP levels were measured in SK-N-MC cells at 12, 24 and 36 h after stimulation with 10 µM isoproterenol or vehicle (C) in cultures parallel to the ones used for the RT-PCR, and normalized in terms of protein quantity. The mean with standard error (bar) of six cultures is shown. Statistical significance of the differences was examined with the Student's *t*-test (\**p* < 0.05).

All subjects gave their informed consent to be included in the study, that was approved by the Ethics Committees of the participating Institutions.

Genotyping was performed on peripheral whole blood genomic DNA. *APOE* genotype was analyzed by RFLP with HhaI. *ARID4A* (rs1051858, Ala779Thr), *DSCI* (rs1789072, intronic), *IFT74* (rs3429, Ile432Thr) and *TMC5* (rs2245085, 3'UTR) genotypes were analyzed with MGB Taqman probes in an ABI PRISM 7900HT.

The distribution of alleles into genotypes was in Hardy-Weinberg equilibrium for controls and cases. Power estimations were performed with standard methods; the power of the test sample to detect the associations with 95% confidence was below 30% for all the SNPs except for the one in *DSCI* (53%) and *APOE4* (100%).

Genotype distributions were compared using the  $\chi^2$ -test. For the *DSCI* SNP, logistic regression models adjusted by age at AD onset, gender and sample origin were used to calculate the strength of association between the genotypes and AD (expressed as the odds ratio [OR] and 95% confidence interval [CI]); the models included interaction terms between *DSCI* genotype and gender. All calculations were performed using SPSS12.0 software.

SK-N-MC neuroblastoma cell activation was monitored with cellular cAMP levels. Fig. 1 shows these were increased at all time points studied, with a maximum at 12 h.

Time course of the different mRNA levels is shown in Fig. 2. The genes selected were the most regulated following adrenergic stimulation, as assayed in an oligonucleotide microarray (manuscript in preparation). The mRNA levels of the 12 induced genes (three upper panels) increased slightly above baseline after 12 h, reaching their maxima after 24 h. For most genes the mRNA levels returned to baseline after 36 h of isoproterenol stimulation, probably because of feedback control.

Two of the upregulated genes, *CREM* and *CREB1*, are cAMP activated transcription factors, and participate in most of the cell functions regulated by cAMP. Interestingly, *CREM* was the most



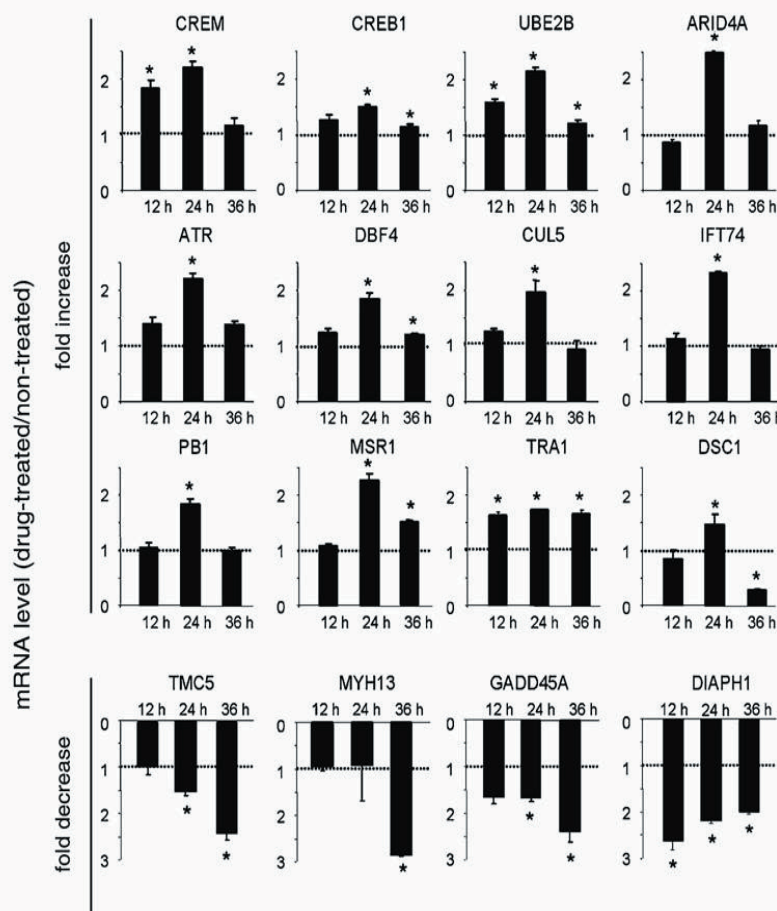


Fig. 2. Isoproterenol regulated gene expression in neuroblastoma cells. The mRNA levels of the indicated genes were measured by quantitative RT-PCR in SK-N-MC cells after 12, 24 and 36 h of stimulation with 10  $\mu$ M isoproterenol, and normalized in terms of *GAPDH* mRNA level. The relative quantity with respect to mock-treated cultures (mean with standard error) is shown. Upregulated genes are shown in the three upper panels and downregulated genes in the lower panel with bars downwards. Horizontal line at 1 is the baseline. Statistical significance of the differences was examined with the Student's *t*-test ( $p < 0.05$ ). Gene description: *CREM* (Entrez Gene ID 1390; chromosome location 10p11.21; camp-response element modulator); *CREB1* (1385; 2q34; cAMP-response element binding protein); *UBE2B* (7320; 5q23-q31; ubiquitin-conjugating enzyme E2 B); *ARID4A* (5926; 14q23.1; AT-rich interactive domain 4A); *ATR* (545; 3q22-q24; ataxia-telangiectasia and Rad3-related gene); *DBF4* (10926; 7q21.3; activator of S-phase kinase); *CUL5* (8065; 11q22-q23; cullin 5); *IFT74* (80173; 9p21.2) *PB1* (55193; 3p21); *MSR1* (4481; 8p22); *TRA1* (7184; 12q24.2-q24.3; tumor rejection antigen 1); *DSC1* (1823; 18q12.1; desmocollin 1); *TMC5* (79838; 16p12.3; transmembrane ion channel 5); *MYH13* (8735; 17p13; muscle fiber component); *GADD45A* (1647; 1p31.2-p31.1; growth arrest and DNA damage-inducible alpha gene); *DIAPH1* (1729; 5q31; cytoskeleton maintenance protein).

upregulated gene at 12 h, and since it is a negative modulator of cAMP-induced transcription, it may participate in the downregulation of the other genes at 36 h. *CREB1* showed a small increase in mRNA levels, but the isoproterenol treatment produced a significant increase in *CREB1* phosphorylation at 24 h (not shown). In accordance with the relevance of cAMP levels in cell cycle [27], five of the upregulated genes (*UBE2B*; *ARID4*; *ATR*; *DBF4* and *CUL5*) participate in cell cycle regulation, whereas the other upregulated genes participate in different functions: vesicular fusion (*IFT74*), transcription processes (*PB1*), intracellular cation trafficking (*MSR1*), stress response (*TRA1*) and cell adhesion (*DSC1*).

Regarding downregulated genes, maximum repression was reached at 36 h of stimulation for *TMC5*, *MYH13* and *GADD45A*, whereas *DIAPH1* reached the maximum repression earlier.

To explore the possible involvement of this functional module in AD susceptibility, we first focused on those genes showing larger expression changes and representing different functions: *ARID4A* (cell cycle) and *IFT74* (vesicular fusion) among the upregulated and *TMC5* as representative of the downregulated genes; *DSC1* was also selected because it was regulated both by adrenergic activation (Fig. 2) and by stimulation of adenylyl cyclase with forskolin ( $4.0 \pm 0.3$ -fold increase  $\pm$  standard error over basal level at 24 h).

One SNPs in each gene was selected based mainly on its position into the gene – on which depends their potential functionality – its minor allele frequency in Caucasians ( $>0.1$ ), and its inclusion in the HapMap database. As shown in Table 1, we found no significant associations with AD, although the *DSC1* SNP rs1789072 showed a weak trend towards a negative association of the C allele with AD. Similar results



Table 1

*DSCI*, *TMC5*, *ARID4*, *IFT74* and *APOE* genotype and allele distribution in the test case-control AD sample (Madrid)

	Genotype distribution <sup>a</sup>			Allele frequency <sup>b</sup>		OR <sup>c</sup>	(χ <sup>2</sup> ; p)
	TT	TC	CC	T	C		
<i>DSCI</i> (rs1789072)							
Cases	169 (0.70)	62 (0.26)	10 (0.04)	0.84	0.16	0.82	0.2
Controls	197 (0.63)	105 (0.32)	10 (0.03)	0.79	0.19		
<i>TMC5</i> (rs2245086)	AA	AC	CC	A	C	1.10	0.6
Cases	173 (0.72)	57 (0.24)	11 (0.05)	0.84	0.16		
Controls	222 (0.72)	82 (0.26)	6 (0.02)	0.85	0.15		
<i>ARID4A</i> (rs1051858)	AA	AG	GG	A	G	1.05	0.7
Cases	137 (0.57)	80 (0.33)	24 (0.10)	0.73	0.27		
Controls	169 (0.54)	112 (0.36)	31 (0.10)	0.72	0.28		
<i>IFT74</i> (rs3429)	GG	GA	AA	G	A	1.2	0.3
Cases	193 (0.80)	46 (0.19)	2 (0.01)	0.90	0.10		
Controls	237 (0.76)	72 (0.23)	3 (0.01)	0.88	0.12		
<i>APOE</i> (number of <i>APOE4</i> alleles)	0	1	2	<i>E4</i>	<i>E2</i> , <i>E3</i>	5.2	10 <sup>−23</sup>
Cases	123 (0.51)	92 (0.38)	26 (0.11)	0.70	0.30		
Controls	265 (0.85)	44 (0.14)	3 (0.01)	0.92	0.08		

<sup>a</sup> Number of individuals with the indicated genotypes. In parentheses, frequency.<sup>b</sup> Figures represent the frequencies of each allele.<sup>c</sup> Odds ratio (minor vs. major allele; *APOE4* vs. *APOE2* plus *APOE3*), plus the *p*-value of the χ<sup>2</sup>-test.

were obtained in the sample stratified for *APOE* genotype (not shown).

Interestingly, gender stratification revealed an apparent gender-specific behaviour of the *DSCI* SNP (not in the other ones, not shown), with a strong association in males. As shown in Table 2, the carriers of the *DSCI* C allele (genotypes TC plus CC) among the male patients were significantly increased compared to male controls (20% versus 40%; *p* = 0.002); no significant difference was seen in the females.

The validity of this observation was then tested in the contrast sample that, as shown in Table 2, also showed a significant

reduction in the proportion of male patients carrying the *DSCI* C allele compared to male controls (26% versus 42%; *p* = 0.017), with no difference between female patients and controls.

Since the two samples showed the same tendency they were pooled to increase the statistical power of the analysis, and logistic regression was used to evaluate the individual effect of *DSCI* and its interaction with gender. Table 3 shows that both *APOE* and *DSCI* contributed significantly to the model, although the AD risk associated with the possession of *APOE4* (OR 5.60) was much higher than the protection associated with the possession of *DSCI* C allele (OR 0.41). Interestingly, the interaction

Table 2

*DSCI* genotype distribution in the AD case-control test (Madrid) and contrast sample (Catalonia) stratified by gender

Gender			<i>DSCI</i> genotype <sup>b</sup>			OR <sup>c</sup>	(χ <sup>2</sup> ; <i>p</i> )
			TT	TC	CC		
Male							
Madrid	Cases	88 <sup>a</sup>	0.80	0.20	0	0.38	0.002
	Controls	123	0.60	0.37	0.03		
Catalonia	Cases	97	0.74	0.23	0.03	0.48	0.017
	Controls	103	0.59	0.36	0.06		
Female							
Madrid	Cases	153	0.65	0.29	0.07	1.04	ns
	Controls	189	0.66	0.31	0.03		
Catalonia	Cases	242	0.66	0.29	0.05	0.97	ns
	Controls	117	0.65	0.32	0.03		

<sup>a</sup> Figures are numbers of individuals.<sup>b</sup> Frequencies of each genotype.<sup>c</sup> OR for *DSCI* CC+TC (any C allele) vs. TT, plus *p*-value (χ<sup>2</sup>-test). The power to detect this association with 95% confidence were 53, 46 and 73% for the Madrid, Catalonia and combined cohorts, respectively; for males, power was of 93, 78 and 99% for the Madrid, Catalonia and combined cohorts, respectively.



Table 3  
Logistic regression analysis of *APOE*, *DSCI* and gender in relation to AD risk in the Madrid and Catalonia samples combined<sup>a</sup>

Variable	p-value	Relative risk (OR)	95% CI
ApoE (×4 vs. no 4)	$1.8 \times 10^{-29}$	5.60	4.15–7.56
<i>DSCI</i> (any C vs. TT)	0.003	0.41	0.25–0.86
Gender (male vs. female)	0.06	0.73	0.53–1.02
Onset	0.34	1.00	0.99–1.01
Sample (Mad vs. Cat)	$1.8 \times 10^{-6}$	0.48	0.37–0.62
<i>DSCI</i> gender <sup>a</sup>	0.008	0.45	0.25–0.81

Figures are the estimated OR and 95% CI, along with the p-value for the contribution of each variable to the model. The *APOE* and *DSCI* genotypes were encoded into dichotomous variables (×4 vs. no 4 and any C vs. TT, respectively).

<sup>a</sup> The Madrid and Catalonia samples were combined after probing that *DSCI* and *APOE* genotype distributions were not significantly different between the two samples, neither in the cases nor in the controls ( $\chi^2$ -test,  $0.35 > p > 0.99$ ).

between *DSCI* genotype and gender also contributed significantly to the model ( $p = 0.008$ ).

In summary, a combined effect of *DSCI* genotype and gender was evident in the two samples studied, with males carrying the *DSCI* C allele enjoying a certain protection against AD.

Many genes have been reported as associated with sporadic AD, although so far only *APOE* has been confirmed by multiple studies [3,4]. Since only 50% of AD patients carry the *APOE4* allele, the identification of the other genes is critical for understanding AD mechanisms. In this work we hypothesized that genes showing significant changes in mRNA levels after adrenergic stimulation of neuronal cells might play a role in AD, because adrenergic activation is the primary response to major head trauma, and cell responsiveness to adrenergic stress appear to correlate with AD susceptibility [6].

The genes studied included *CREM* and *CREB1*, that regulate cAMP-induced transcription; in neurons, cAMP increase activates CREB family members, and CREB-dependent expression regulates diverse processes ranging from development to neural plasticity or diseases [17].

In agreement with cAMP role in cell cycle, several of the regulated genes (*UBE2B* [24], *ARID4A* [7], *ATR*, *DBF4* [29], *CUL5* [12] and *GADD45A*) are involved in the control of the cell cycle and proliferation; in our neuronal model, adrenergic stimulation arrested cells in the G2/M phase, but in the presence of apoptotic stimuli, it prevented cell death (manuscript in preparation).

The induction of *TRAI*, which encodes the heat shock protein grp94 (one of the main mediators of the unfolded protein response [UPR]) [15] suggests that adrenergic stimulation might induce neuronal ER stress.

Interestingly, two of our adrenergic responder genes (*ARID4A* and *PBI*) have been reported as early stage markers of AD pathogenesis in a recent microarray study [5].

The present study revealed the association of *DSCI* with AD in two independent case-control samples, with the *DSCI* C allele of the SNP rs1789072 showing a protective effect in males. A gender-specific effect in AD has been reported for other genes such as *TAU* [28], *MPO* [23] and *ESR2* [21]. Since the *DSCI* C allele is protective in males but not in females, it may be one of the factors responsible for the lower incidence and/or

different clinical manifestations of AD in males compared to females [2].

Regarding potential roles of *DSCI* in AD, it should be mentioned that *DSCI* is a member of the desmosomal cadherins, a superfamily of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent cell adhesion molecules that mediate cell–cell adhesion and interact with the cytoskeleton [10]. Recently, Smith et al. [26] reported that the desmocollins are regulated by members of the C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) family of transcription factors and, interestingly, C/EBPdelta is overexpressed in the cortex of AD patients [16]; in addition, C/EBP proteins have cAMP-inducible activities and bind to CRE motifs [1].

In conclusion, the present results show a *DSCI* polymorphism to be associated with AD risk in a gender-influenced manner, and support the potential involvement of the adrenergic signaling pathway in AD pathogenesis.

## Acknowledgements

Work supported by *Obra Social Caja Madrid*, *Comunidad Autónoma de Madrid* (Grupos Estratégicos and GR/SAL/0783/2004), *Ministerio de Educación y Ciencia* (GEN2003-20235-C05-05), and *Ministerio de Sanidad y Consumo* (*Instituto de Salud Carlos III*; RTIC C03/07 and RTIC C03/06). The institutional grant of the *Fundación Ramón Areces* to the *Centro de Biología Molecular Severo Ochoa* is gratefully acknowledged. We thank Drs. P. Gil, P. Coria and A. Labad-Alquézar for their cooperation in generating the case-control samples. We are grateful to the *Asociación de Familiares de Alzheimer de Madrid* (AFAL) for continuous encouragement and help. This work was made possible by the generous participation of the subjects and their families.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.neulet.2006.09.005.

## References

- [1] O. Bakker, M.G. Parker, CAAT/enhancer binding protein is able to bind to ATF/CRE elements, *Nucl. Acids Res.* 19 (1991) 1213–1217.
- [2] L.L. Barnes, R.S. Wilson, J.L. Bienias, J.A. Schneider, D.A. Evans, D.A. Bennett, Sex differences in the clinical manifestations of Alzheimer disease pathology, *Arch. Gen. Psychiatry* 62 (2005) 685–691.
- [3] L. Bertram, R.E. Tanzi, Alzheimer's disease: one disorder, too many genes? *Hum. Mol. Genet.* 13 (1) (2004) R135–R141.
- [4] L. Bertram, R.E. Tanzi, The genetic epidemiology of neurodegenerative disease, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 1449–1457.
- [5] E.M. Blalock, J.W. Geddes, K.C. Chen, N.M. Porter, W.R. Markesbery, P.W. Landfield, Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 2173–2178.
- [6] M.J. Bullido, M.C. Ramos, A. Ruiz-Gomez, A.S. Tutor, I. Sastre, A. Frank, F. Coria, P. Gil, F. Mayor Jr., F. Valdivieso, Polymorphism in genes involved in adrenergic signaling associated with Alzheimer's, *Neurobiol. Aging* 25 (2004) 853–859.
- [7] Y.F. Chen, H.H. Chiu, C.H. Wu, J.Y. Wang, F.M. Chen, W.H. Tzou, S.J. Shin, S.R. Lin, Retinoblastoma protein (pRB) was significantly phosphorylated through a Ras-to-MAPK pathway in mutant K-ras stably transfected human adrenocortical cells, *DNA Cell Biol.* 22 (2003) 657–664.



- [8] E.H. Corder, A.M. Saunders, W.J. Strittmatter, D.E. Schmechel, P.C. Gaskell, G.W. Small, A.D. Roses, J.L. Haines, M.A. Pericak-Vance, Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families, *Science* 261 (1993) 921–923.
- [9] R. Diaz-Arrastia, Y. Gong, S. Fair, K.D. Scott, M.C. Garcia, M.C. Carlile, M.A. Agostini, P.C. Van Ness, Increased risk of late posttraumatic seizures associated with inheritance of APOE epsilon4 allele, *Arch. Neurol.* 60 (2003) 818–822.
- [10] S. Getsios, E.V. Amargo, R.L. Dusek, K. Ishii, L. Sheu, L.M. Godsel, K.J. Green, Coordinated expression of desmoglein 1 and desmocollin 1 regulates intercellular adhesion, *Differentiation* 72 (2004) 419–433.
- [11] Z. Guo, L.A. Cupples, A. Kurz, S.H. Auerbach, L. Volicer, H. Chui, R.C. Green, A.D. Sadovnick, R. Duara, C. DeCarli, K. Johnson, R.C. Go, J.H. Growdon, J.L. Haines, W.A. Kukull, L.A. Farrer, Head injury and the risk of AD in the MIRAGE study, *Neurology* 54 (2000) 1316–1323.
- [12] M.L. Heuze, F.C. Guibal, C.A. Banks, J.W. Conaway, R.C. Conaway, Y.E. Cayre, A. Benecke, P.G. Lutz, ASB2 is an Elongin BC-interacting protein that can assemble with Cullin 5 and Rbx1 to reconstitute an E3 ubiquitin ligase complex, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 5468–5474.
- [13] J.I. Hwang, S. Choi, I.D. Fraser, M.S. Chang, M.I. Simon, Silencing the expression of multiple Gbeta-subunits eliminates signaling mediated by all four families of G proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005) 9493–9498.
- [14] K.A. Jellinger, Head injury and dementia, *Curr. Opin. Neurol.* 17 (2004) 719–723.
- [15] A.S. Lee, The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications, *Trends Biochem. Sci.* 26 (2001) 504–510.
- [16] R. Li, R. Strohmeier, Z. Liang, L.F. Lue, J. Rogers, CCAAT/enhancer binding protein delta (C/EBPdelta) expression and elevation in Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging* 25 (2004) 991–999.
- [17] B.E. Lonze, D.D. Ginty, Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system, *Neuron* 35 (2002) 605–623.
- [18] D.A. Mason, J.D. Moore, S.A. Green, S.B. Liggett, A gain-of-function polymorphism in a G-protein coupling domain of the human beta1-adrenergic receptor, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 12670–12674.
- [19] C.R. McCudden, M.D. Hains, R.J. Kimple, D.P. Siderovski, F.S. Willard, G-protein signaling: back to the future, *Cell Mol. Life Sci.* 62 (2005) 551–577.
- [20] G. McKhann, D. Drachman, M. Folstein, R. Katzman, D. Price, E.M. Stadlan, Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease, *Neurology* 34 (1984) 939–944.
- [21] M. Pirskanen, M. Hiltunen, A. Mannermaa, S. Helisalmi, M. Lehtovirta, T. Hanninen, H. Soininen, Estrogen receptor beta gene variants are associated with increased risk of Alzheimer's disease in women, *Eur. J. Hum. Genet.* 13 (2005) 1000–1006.
- [22] C.R. Plata-Salaman, Brain injury and immunosuppression, *Nat. Med.* 4 (1998) 768–769.
- [23] W.F. Reynolds, J. Rhees, D. Maciejewski, T. Paladino, H. Sieburg, R.A. Maki, E. Masliah, Myeloperoxidase polymorphism is associated with gender specific risk for Alzheimer's disease, *Exp. Neurol.* 155 (1999) 31–41.
- [24] H.P. Roest, W.M. Baarends, J. de Wit, J.W. van Klaveren, E. Wassenaar, J.W. Hoogerbrugge, W.A. van Cappellen, J.H. Hoeijmakers, J.A. Grootegeod, The ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme HR23A is a maternal factor essential for early embryonic development in mice, *Mol. Cell Biol.* 24 (2004) 5485–5495.
- [25] M. Rosich-Estrago, L. Figuera-Terre, B. Mulet-Perez, M.T. Arrufat-Cardus, A. Pascual San Emeterio, I. Arbeola-Rigau, A. Labad-Alquezar, E. Vilella-Cuadrada, Dementia and cognitive impairment pattern: its association with epsilon4 allele of apolipoprotein E gene, *Rev. Neurol.* 38 (2004) 801–807.
- [26] C. Smith, K. Zhu, A. Merritt, R. Picton, D. Youngs, D. Garrod, M. Chidgey, Regulation of desmocollin gene expression in the epidermis: CCAAT/enhancer-binding proteins modulate early and late events in keratinocyte differentiation, *Biochem. J.* 380 (2004) 757–765.
- [27] P.J. Stork, J.M. Schmitt, Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation, *Trends Cell Biol.* 12 (2002) 258–266.
- [28] H. Tanahashi, T. Asada, T. Tabira, Association between tau polymorphism and male early-onset Alzheimer's disease, *Neuroreport* 15 (2004) 175–179.
- [29] J. Turner, C. Koumenis, T.E. Kute, R.P. Planalp, M.W. Brechbiel, D.I. Beardsley, B. Cody, K.D. Brown, F.M. Torti, S.V. Torti, Tachpyridine, a metal chelator, induces G2 cell cycle arrest, activates checkpoint kinases, and sensitizes cells to ionizing radiation, *Blood* (2005).
- [30] H. Wang, G.D. Ferguson, V.V. Pineda, P.E. Cundiff, D.R. Storm, Overexpression of type-1 adenylyl cyclase in mouse forebrain enhances recognition memory and LTP, *Nat. Neurosci.* 7 (2004) 635–642.
- [31] J.A. Waschek, E.M. Diccico-Bloom, V. Lelievre, X. Zhou, Z. Hu, PACAP action in nervous system development, regeneration, and neuroblastoma cell proliferation, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 921 (2000) 129–136.
- [32] H.S. Wilson, A. Skodol, Special report: DSM-IV: overview and examination of major changes, *Arch. Psychiatry Nurs.* 8 (1994) 340–347.

---

ANEXO II-D

---





Neurobiology of Aging 28 (2007) 519–523

---

**NEUROBIOLOGY  
OF  
AGING**


---

www.elsevier.com/locate/neuaging

Brief communication

## A *TAP2* genotype associated with Alzheimer's disease in *APOE4* carriers

María J. Bullido<sup>a</sup>, Ana Martínez-García<sup>a,1</sup>, María J. Artiga<sup>a,1</sup>, Jesús Aldudo<sup>a</sup>,  
Isabel Sastre<sup>a</sup>, Pedro Gil<sup>b</sup>, Francisco Coria<sup>c</sup>, David G. Muñoz<sup>d</sup>,  
Vladimir Hachinski<sup>e</sup>, Ana Frank<sup>f</sup>, Fernando Valdivieso<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biología Molecular and Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (C.S.I.C.-U.A.M.),  
Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Servicio de Geriátrica, Hospital Clínico de San Carlos, 28003 Madrid, Spain  
<sup>c</sup> 07014 Palma de Mallorca, Spain

<sup>d</sup> University of Toronto & St. Michael's Hospital, Toronto, Canada

<sup>e</sup> University of Western Ontario, London, Canada

<sup>f</sup> Servicio de Neurología, Hospital Universitario La Paz (UAM), 28034 Madrid, Spain

Received 2 December 2005; received in revised form 16 February 2006; accepted 18 February 2006

Available online 3 April 2006

### Abstract

Sporadic Alzheimer's disease (AD) appears to be the consequence of the interaction between combinations of genes and environmental factors. Binding with the transporter associated with antigen processing (TAP) is thought to be the main way in which herpes simplex virus type 1 (HSV-1) evades immune surveillance. Several *TAP* gene polymorphisms were examined and a *TAP2* SNP (rs241448) associated with AD found in two independent case-control samples, especially in carriers of the *APOE4* allele. These findings are consistent with the hypothesis that human genetic variants facilitating the access of HSV-1 to the brain might result in susceptibility to AD.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Alzheimer's disease; Genetic risk factor; *TAP*; *APOE*; Interaction

### 1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder characterized by deteriorating cognitive ability in later life. Its worldwide prevalence is about 1% in 60–64-year olds, rising to approximately 50% by age 95 [11]. The vast majority of AD cases have a complex etiology, with multiple genetic and environmental factors influencing pathogenesis. The  $\epsilon 4$  allele of the apolipoprotein E gene (*APOE4*) is the main genetic risk factor for sporadic AD [4,8], although the mechanisms responsible for this association are not well understood. It has been reported that the

possession of *APOE4* plus the presence of the herpes simplex virus type 1 (HSV-1) genome in the brain confers an increased risk of developing AD compared to the possession of *APOE4* alone [12]. We have reported that some *APOE* promoter polymorphisms lead to variations in transcriptional activity that result in increased susceptibility to AD [5]. In addition we have recently reported the involvement of apoE in the hematogenous route of HSV-1's access to the central nervous system, the *APOE* dose being directly linked to the degree of neuroinvasiveness [6], and apoE4 being more efficient than apoE3 in allowing the virus access to the brain [7].

Given this background, the present work used genetic association to test the hypothesis that human genes important in HSV-1 biology participate in AD pathogenesis. The transporters associated with antigen processing (*TAP*) genes

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 497 84 71; fax: +34 91 497 48 70.

E-mail address: fvaldivieso@cbm.uam.es (F. Valdivieso).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.



are interesting candidates for such a study since binding to TAP is thought to be the main way in which HSV-1 evades the immune response [2]; the viral protein ICP47 blocks the peptide-binding site of TAP, thus preventing antigen presentation to the immune system. TAP1 and TAP2 belong to the ATP-binding cassette (ABC) superfamily of transporter molecules and play a pivotal role in the adaptive immune response, forming heterodimeric complexes that delivers cytosolic peptides to the lumen of the endoplasmic reticulum where they associate with MHC class I molecules [15].

*TAP* genes map within the class II MHC region of chromosome 6 (6 p21.3, 30 cM), relatively close (about 30 cM away) to one of the AD loci consistently identified by genetic linkage and association studies [3] (see up-to-date reports at the Alzforum web page: <http://www.alzforum.org>). There are seven haplotypes of *TAP1* and four of *TAP2* with significant frequencies in Caucasian populations (see sequences and official nomenclature for TAP haplotypes at [http://www.anthonynolan.com/HIG/nomen/nomen\\_index.html](http://www.anthonynolan.com/HIG/nomen/nomen_index.html)). These haplotypes are defined by combinations of single nucleotide polymorphisms (SNPs), from which those tagging major haplotypes were selected for a genetic association study in a case–control sample of AD. An independent case–control sample, with pathological confirmation, was then analyzed to validate the findings.

## 2. Subjects and methods

### 2.1. Patients and controls

The test sample consisted of 571 individuals from central Spain. These included 253 patients with sporadic AD (mean age at onset  $71.2 \pm 10.8$  years; mean  $\pm$  S.D.; 63% females) recruited at the neurology departments of the participating hospitals. The controls were 318 healthy individuals (mean age at examination  $73.3 \pm 12.8$  years; 60% females). All subjects gave their informed consent to be included in the study. All ‘case’ subjects had a diagnosis of probable AD according to the NINCDS-ADRA [16] or DSMIV [17] criteria for Alzheimer’s dementia. The controls were subjected to a Mini Mental test. This sample had previously been genotyped for *APOE* and other polymorphic genes [5].

The Canadian sample was composed of 100 patients with AD (mean age at onset  $70.2 \pm 10.6$  years; mean  $\pm$  S.D.; 63% females) and 178 controls (mean age at examination  $76.3 \pm 12.8$  years; 48% females). All these patients underwent an autopsy at the London Health Sciences Center, University of Western Ontario. The criteria for AD included a diagnosis of dementia by a neurologist and a NIA/Reagan score showing a high probability that dementia was due to AD. The criteria for controls was a documented normal mental status (not necessarily recorded by a neurologist) on clinical exam prior to death, and a NIA/Reagan score showing a low probability of AD [1].

### 2.2. Genotyping

*APOE*, *TAP1*333 (dbSNP rs4148880), *TAP1*637 (rs1800453) and *TAP2*379 (dbSNP rs4148873) genotyping was performed by RFLP with the appropriate restriction enzymes following standard methods (detailed protocols available upon request). *TAP2*687 (rs241448), that discriminates *TAP2*\*0201 from the other major *TAP2* haplotypes (*TAP2*\*0101, \*0102 and \*0103), was analyzed with MGB-Taqman probes (AB assay Id C\_2961793\_10) following the manufacturer’s instructions.

### 2.3. Statistics

Genotypes and allele distributions were compared using the  $\chi^2$  test. Logistic regression models adjusted by age at AD onset, gender and sample origin were used to calculate the strength of association between the genotypes and AD (expressed as the odds ratio [OR] and 95% confidence intervals [CI]). All calculations were performed with SPSS12.0 software.

## 3. Results

Table 1 shows there were no differences in the distribution of the genotypes between cases and controls for any of the SNPs in *TAP1*. The same was observed for *TAP2*379. However, for *TAP2*687, the C allele and the CC genotype were significantly more common in AD patients than in controls (odds ratio 1.51 (95% CI 1.16–1.97) and 2.14 (95% CI 1.16–3.93), respectively). Since *TAP2* alleles are in linkage disequilibrium with HLA-DRB1 haplotypes, the possibility that this might be the reason for this association was explored. The HLA-DRB1 genotypes of a subsample of 100 individuals were determined and, as reported for other Caucasian populations [10], significant linkage was found between *TAP2*687C (687 Stop) and HLA DR3 and DR4 ( $p = 0.0001$  [ $\chi^2$  test]; data not shown). The *TAP2*687 genotypes in the DR3/DR4 carriers showed (as in the whole sample) an increased frequency of the *TAP2*687C allele in the cases (18% compared to 7% in controls), although this difference did not reach significance ( $p = 0.12$  [ $\chi^2$  test]). This suggests that the association of *TAP2*687C with AD is not attributable to a linkage disequilibrium with the HLA DRB haplotypes, although we cannot completely exclude this possibility.

In the context of the working hypothesis, *APOE* and *TAP* are important for HSV-1 infectivity, and both showed genetic association with AD in the test sample. If there were any biological interaction between these two genes with respect to AD pathogenesis, this would be reflected in the risk of developing the disease. A search was therefore made for possible interactions between the *APOE4* and *TAP2*687C alleles.

We first studied the effect of *TAP2*687 in the sample stratified for *APOE* genotype. As shown in Table 2A, the relative risk for *TAP2*687CC genotype was higher in carriers of the



Table 1  
*TAP1*, *TAP2* and *APOE* genotype distribution in a case–control AD sample

$n^a$		<i>TAP1</i> 333 (rs4148880) <sup>b</sup>			OR <sup>c</sup> ( $\chi^2$ )
		AA	AG	GG	
Cases	215	0.71	0.28	0.02	0.92 (n.s.)
Controls	315	0.68	0.30	0.02	
$n^a$		<i>TAP1</i> 637 (rs1800453) <sup>b</sup>			OR <sup>c</sup> ( $\chi^2$ )
		AA	AG	GG	
Cases	215	0.70	0.29	0.01	1.00 (n.s.)
Controls	315	0.70	0.29	0.01	
$n^a$		<i>TAP2</i> 379 (rs4148873) <sup>b</sup>			OR <sup>c</sup> ( $\chi^2$ )
		AA	AG	GG	
Cases	207	0.80	0.20	0.01	0.90 (n.s.)
Controls	318	0.77	0.22	0.01	
$n^a$		<i>TAP2</i> 687 (rs241448) <sup>b</sup>			OR <sup>c</sup> ( $\chi^2$ )
		TT	TC	CC	
Cases	231	0.45	0.43	0.12	1.51 (0.002)
Controls	318	0.56	0.38	0.06	
$n^a$		<i>APOE</i> (number of <i>APOE4</i> alleles) <sup>b</sup>			OR <sup>c</sup> ( $\chi^2$ )
		0	1	2	
Cases	240	0.51	0.38	0.11	3.17 (10 <sup>−15</sup> )
Controls	318	0.86	0.13	0.06	

<sup>a</sup> Number of individuals. The differences among groups are due to “missed” genotypes.

<sup>b</sup> Figures represent the frequencies of each genotype. The SNPs are denoted by their dbSNPs reference codes.

<sup>c</sup> OR for the minority allele of each polymorphism, plus the *p*-value obtained in the  $\chi^2$  test.

*APOE4* allele compared to non-carriers, suggesting a possible interaction of the two genotypes with respect to AD risk.

The validity of this observation was then tested in the Canadian, autopsy-based, case–control sample. The results, shown in Table 2A, showed the same tendency as in the test sample, i.e., a significant increase in the homozygous frequency of *TAP2*687C among cases who were carriers of the *APOE4* allele. Since the two samples showed the same tendency, the results were pooled to increase the statistical power of a logistic regression analysis (although both samples showed the same results when studied separately; not shown). This was used to assess the individual effect of each gene, adjusting by age at onset, gender and the origin of the sample. *APOE* and *TAP2*687 genotypes were coded as dichotomic variables (*APOE*—one or two 4 alleles or no 4 allele at all; *TAP2*687—any T allele or CC genotype). Both *APOE* and *TAP2*687 contributed significantly to the risk of developing AD, although as expected from the raw data the risk of AD attributable to *APOE* (OR 4.1; 95% CI 3.1–5.3) was higher than that corresponding to *TAP2*687 (OR 1.7; 95% CI 1.1–2.6).

Finally, the risk associated with the genotype combinations of the two genes was evaluated in a logistic regression model adjusted for age at AD onset, gender and sample origin. Table 2B clearly indicates that carrying the *APOE4* and two *TAP2*687C alleles is strongly associated with AD.

In summary, the different analyses performed suggest a combined effect of the *APOE4* allele and the *TAP2*687CC genotype in the two samples studied, with individuals carrying both factors showing a high probability of belonging to the AD patients.

#### 4. Discussion

*APOE4* is the only universally accepted genetic risk factor for sporadic AD [4]; higher apoE levels also seem associated with an increased risk [5,14]. We recently reported that the entry of HSV-1 into the brain via the hematogenous route is better facilitated by *APOE4* compared to *APOE3* [7] and by a higher dose of apoE [6]. Together with the previously reported potentiation of the risk conferred by *APOE4* in the presence of HSV-1 in the brain [12], the above evidence suggests that HSV-1, somehow interacting with *APOE*, is involved in AD pathogenesis. In addition, Lambert et al. [13] have reported an association between LBP-1c/CP2/LSF and the risk of AD; this transcription factor is involved in the activation of human immunodeficiency and herpes simplex viruses.

The present work explores the possibility that *TAP*, via which HSV-1 evades the immune system [2], might participate in the pathogenic process of AD and in susceptibility to



Table 2  
Association of *TAP2687* and *APOE* with AD

APOE genotype	TAP2687 genotype <sup>a</sup>			OR <sup>b</sup> ( $\chi^2$ ; <i>p</i> )
	TT	TC	CC	
Effect of TAP2687 in the sample stratified for APOE <sup>c</sup>				
Spain				
No 4				
Cases	53 (0.46)	49 (0.42)	14 (0.12)	1.95 (n.s.)
Controls	146 (0.57)	95 (0.37)	17 (0.07)	
Any 4				
Cases	47 (0.45)	45 (0.43)	13 (0.12)	5.93 (0.05)
Controls	25 (0.58)	17 (0.40)	1 (0.02)	
Canada				
No 4				
Cases	51 (0.68)	20 (0.27)	4 (0.05)	1.30 (n.s.)
Controls	93 (0.65)	45 (0.31)	6 (0.04)	
Any 4				
Cases	12 (0.49)	5 (0.20)	8 (0.31)	7.50 (0.01)
Controls	18 (0.53)	14 (0.41)	2 (0.06)	
APOE genotype	TAP2687 genotype	Relative risk (OR)		95% CI
Combined effect of APOE and TAP2687 <sup>d</sup>				
No 4	Any T	Ref		0.8–2.2
	CC	1.3		
Any 4	Any T	3.8		2.9–4.9
	CC	14.7		

<sup>a</sup> Figures are numbers of individuals. Frequencies are shown in parentheses.

<sup>b</sup> OR for *TAP2687*CC vs. TT + TC (any T allele), plus *p* value ( $\chi^2$  test).

<sup>c</sup> *TAP2* genotype distribution in the AD case–control test sample (Spain) and contrast sample (Canada) stratified by apoE genotype.

<sup>d</sup> Effect of *APOE*/*TAP2* genotype combinations. Figures are the estimated OR and 95% CI. The logistic regression model was adjusted for age at onset, gender and sample origin.

the disease. Of the SNPs analyzed, the *TAP2687C* allele (a tag SNP of *TAP2*\*0201 haplotype) appears to be clearly associated with AD susceptibility. In particular, homozygosity for *TAP2687C* in carriers of the *APOE4* leads to a risk comparable to that reported for *APOE4* homozygosity [4]. This observation was made in two case–control samples (one clinically and one autopsy-based) obtained independently from two countries.

The results indicate that carrying the *APOE4* and two *TAP2687C* alleles confers a high risk of developing AD. Thus, although the two patient populations studied were clearly different, as reflected by the different frequency of *APOE4* in the patients (very low in the Canadian sample compared to the Spanish test sample), the combined effect of *APOE4* and *TAP2687C* was observed in both. This suggests that this genotype combination is a strong risk factor observable over the noise caused by different population backgrounds, sampling designs, etc., although the possibility of a false positive association due to multiple testing cannot be completely excluded.

Functional anomalies in TAP due to somatic mutations or to rare polymorphisms have been reported in a variety of cancers. Although the most common *TAP* polymorphisms do

not alter peptide binding or translocation to the ER [9], the possibility that they affect the interaction of TAP with ICP47, thus influencing HSV-1's evasion of the immune system, has not been analyzed and cannot be ruled out. HSV-1 has been associated with sporadic AD [12], and both apoE [6,7] and TAP [2] are involved in HSV-1 neuroinvasiveness, although it cannot be discarded that *TAP2* involvement in AD is unrelated to HSV-1.

The present results suggest that the combined *APOE*/*TAP2* genotype is a good genetic marker of the possibility of developing AD, whether *TAP2* is the primary risk factor or a marker of another locus. They also leave open the interesting possibility of a link between the central nervous system's genetic susceptibility to viral infections and the onset of neurodegenerative diseases.

## Acknowledgements

This work was supported by the Obra Social Caja Madrid, Comunidad Autónoma de Madrid (Programa de Grupos Estratégicos and GR/SAL/0783/2004), the Ministerio de Educación y Ciencia (GEN2003-20235-C05-05), and the Ministerio de Sanidad y Consumo (Instituto de Salud Carlos III; RTIC C03/07 and RTIC C03/06). The institutional grant awarded by the Fundación Ramón Areces to the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa is gratefully acknowledged. We thank Dr. E. Díez-Tejedor for advice on clinical work, and to the Asociación de Familiares de Alzheimer de Madrid (AFAL) for continuous encouragement and help. This work was made possible by the generous participation of the patients, the controls and their families.

## References

- [1] Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer's disease. The National Institute on Aging, and Reagan Institute Working Group on Diagnostic Criteria for the Neuropathological Assessment of Alzheimer's Disease. *Neurobiol Aging* 1997;18(4 Suppl):S1–2.
- [2] Bauer D, Tampe R. Herpes viral proteins blocking the transporter associated with antigen processing TAP—from genes to function and structure. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002;269:87–99.
- [3] Bertram L, Tanzi RE. Alzheimer's disease: one disorder, too many genes? *Hum Mol Genet* 2004;13 Spec(1):R135–41.
- [4] Bertram L, Tanzi RE. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J Clin Invest* 2005;115(6):1449–57.
- [5] Bullido MJ, Artiga MJ, Recuero M, Sastre I, Garcia MA, Aldudo J, et al. A polymorphism in the regulatory region of *APOE* associated with risk for Alzheimer's dementia. *Nat Genet* 1998;18(1):69–71.
- [6] Burgos JS, Ramirez C, Sastre I, Bullido MJ, Valdivieso F. Involvement of apolipoprotein E in the hematogenous route of herpes simplex virus type 1 to the central nervous system. *J Virol* 2002;76(23):12394–8.
- [7] Burgos JS, Ramirez C, Sastre I, Bullido MJ, Valdivieso F. apoE4 is more efficient than E3 in brain access by herpes simplex virus type 1. *Neuroreport* 2003;14(14):1825–7.
- [8] Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele

- and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993;261(5123):921–3.
- [9] Daniel S, Caillat-Zucman S, Hammer J, Bach JF, van Endert PM. Absence of functional relevance of human transporter associated with antigen processing polymorphism for peptide selection. *J Immunol* 1997;159(5):2350–7.
- [10] Djilali-Saiah I, Benini V, Daniel S, Assan R, Bach JF, Caillat-Zucman S. Linkage disequilibrium between HLA class II (DR, DQ, DP) and antigen processing (LMP, TAP, DM) genes of the major histocompatibility complex. *Tissue Antigens* 1996;48(2):87–92.
- [11] Fratiglioni L, De Ronchi D, Aguero-Torres H. Worldwide prevalence and incidence of dementia. *Drugs Aging* 1999;15(5):365–75.
- [12] Itzhaki RF, Dobson CB, Shipley SJ, Wozniak MA. The role of viruses and of APOE in dementia. *Ann NY Acad Sci* 2004;1019:15–8.
- [13] Lambert JC, Goumidi L, Vrieze FW, Frigard B, Harris JM, Cummings A, et al. The transcriptional factor LBP-1c/CP2/LSF gene on chromosome 12 is a genetic determinant of Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 2000;9(15):2275–80.
- [14] Laws SM, Hone E, Gandy S, Martins RN. Expanding the association between the APOE gene and the risk of Alzheimer's disease: possible roles for APOE promoter polymorphisms and alterations in APOE transcription. *J Neurochem* 2003;84(6):1215–36.
- [15] McCluskey J, Rossjohn J, Purcell AW. TAP genes and immunity. *Curr Opin Immunol* 2004;16(5):651–9.
- [16] McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984;34(7):939–44.
- [17] Wilson HS, Skodol A. Special report: DSM-IV: overview and examination of major changes. *Arch Psychiatr Nurs* 1994;8(6):340–7.



---

## ANEXO II-E

---







## Double stranded RNA activated EIF2 $\alpha$ kinase (*EIF2AK2*; *PKR*) is associated with Alzheimer's disease

María J. Bullido<sup>a</sup>, Ana Martínez-García<sup>a,1</sup>, Raquel Tenorio<sup>a,1</sup>, Isabel Sastre<sup>a</sup>,  
David G. Muñoz<sup>b</sup>, Ana Frank<sup>c</sup>, Fernando Valdivieso<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biología Molecular and Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (C.S.I.C.-U.A.M.),  
Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

<sup>b</sup> University of Toronto & St. Michael's Hospital, Toronto, Canada

<sup>c</sup> Servicio de Neurología, Hospital Universitario La Paz (UAM), 28034 Madrid, Spain

Received 26 October 2006; received in revised form 9 February 2007; accepted 15 February 2007

### Abstract

Sporadic Alzheimer's disease (AD) appears to be the consequence of the interaction between combinations of genes and environmental factors (for example virus infections). To test this hypothesis, we are examining human genes relevant to herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection via genetic association studies in AD case-control samples. Recently, we found that a variant in *TAP2*, a major target used by HSV-1 to evade immune surveillance, is associated with AD. The present work analyses another gene involved in the host cell response to HSV-1, *EIF2AK2* (eukaryotic translation initiation factor 2- $\alpha$  kinase 2; coding for PKR); PKR mediates the virus-induced shut-off of translation, and levels of activated PKR are high in the brains of AD patients. An *EIF2AK2* SNP (rs2254958) located in the 5'-UTR region within an exonic splicing enhancer was found to be associated with AD. More specifically: the C allele was more commonly found in the patients and, compared to non-CC genotypes, the CC homozygotes showed earlier (around 3.3 years) onset of AD, especially in the absence of the *APOE4* allele. These results further support the hypothesis that variants of human genes participating in HSV-1 infection modulate the susceptibility and/or clinical manifestations of AD.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Alzheimer; Genetic association; PKR; *EIF2AK2*; Onset age

### 1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder characterized by deteriorating cognitive ability in later life. Its worldwide prevalence is about 1% in 60–64-year-olds, rising to approximately 50% by age 95 (Fratiglioni et al., 1999). The vast majority of cases of AD have a complex etiology, with multiple genetic and environmental factors influencing pathogenesis. The  $\epsilon 4$  allele of the apolipoprotein E gene (*APOE4*) is the main genetic risk factor for sporadic AD (Bertram and Tanzi, 2005; Corder et al., 1993), although

the mechanisms responsible for this association are not well understood. It has been reported that the possession of *APOE4* plus the presence of the herpes simplex virus type 1 (HSV-1) genome in the brain confers an increased risk of developing AD compared to the possession of *APOE4* alone (Itzhaki and Wozniak, 2006). We have reported that some *APOE* promoter polymorphisms lead to variations in transcriptional activity that result in increased susceptibility to AD (Bullido et al., 1998). In addition we have indicated the involvement of apoE in the hematogenous route of HSV-1's access to the central nervous system, the *APOE* dose being directly linked to the degree of neuroinvasiveness (Burgos et al., 2002). We have also reported apoE4 to be more efficient than apoE3 in allowing the virus access to the brain (Burgos et al., 2003). On the other hand, we are using genetic

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 497 84 71; fax: +34 91 497 48 70.  
E-mail address: fvaldivieso@cbm.uam.es (F. Valdivieso).

<sup>1</sup> These two authors contributed equally to this work.



association studies to test if human genes important in HSV-1 biology could participate in AD pathogenesis. Recently, we found that a variant in *TAP2*, a major target used by HSV-1 to evade immune surveillance, is associated with AD (Bullido et al., 2007). We performed a study on the genes coding for the transporters associated with antigen processing (TAPs): *TAP1* and *TAP2* belong to the ATP-binding cassette (ABC) superfamily of transporters and play a pivotal role in the adaptive immune response, forming heterodimeric complexes (the TAP complex) that delivers cytosolic peptides to the lumen of the endoplasmic reticulum where they associate with MHC class I molecules (McCluskey et al., 2004). Furthermore, TAP is considered the main way in which HSV-1 evades the immune response, because the viral protein ICP47 binds to TAP, blocking its peptide-binding site and thus preventing the presentation of the infection induced antigens to the immune system (Bauer and Tampe, 2002); consequently, TAP was considered a nice candidate to test the hypothesis. Interestingly, we found that *TAP2* was associated with AD, and that the combined *APOE/TAP2* genotype is a good genetic marker of the possibility of developing AD (Bullido et al., 2007). The finding was, consequently, in agreement with the idea that genetic variants facilitating the entry of HSV-1 to the central nervous system might increase susceptibility to AD, and lead us to look for genetic association in other genes relevant to HSV-1 biology.

In the present work, we focused on another gene that plays a very important role in infection, the double-stranded RNA activated EIF2  $\alpha$  kinase (*EIF2AK2*; eukaryotic translation initiation factor 2- $\alpha$  kinase 2, Entrez ID 5610; coding for PKR) (for a recent review, see Garcia et al., 2006). Two lines of evidence suggest this to be an interesting candidate for such a study. Firstly, PKR is activated by infection and plays a key role in the shut-off of the cell protein synthesis induced by many viruses (He, 2006), among them HSV-1 (Mohr, 2004). In its activated form, PKR phosphorylates the transcription initiation factor EIF2  $\alpha$ . This inactivates EIF2  $\alpha$ , thus producing a general inhibition of protein synthesis. Although the shut-off of host-driven protein synthesis might be advantageous to the virus, it can, however, lead to apoptosis, as reported for other signals derived from the endoplasmic reticulum (ER) stress response. In this regard, HSV-1 encodes two proteins that participate in the control of PKR signaling: Us11, which inhibits PKR activation (Mohr, 2004; Wilson and Skodol, 1994), and a phosphatase-infected cell protein 34.1 (ICP34.1)—that dephosphorylates EIF2  $\alpha$ , returning it to its active form (He, 2006; Mohr, 2004). In summary, the interplay between HSV-1 and PKR is a key point in the interaction of the virus with the infected neuron. Secondly, there is growing evidence that the phosphorylation of EIF2  $\alpha$  (Chang et al., 2002) and the activation of PKR (Onuki et al., 2004; Peel, 2004; Peel and Bredesen, 2003) are associated with neuronal degeneration in AD and other neurodegenerative diseases (Peel, 2004). Although the mechanisms for this association is unknown to date, both PKR and EIF2  $\alpha$  are activated in response to ER stress, and

an increasing body of evidence suggest that impairment of ER functioning may be a common denominator of pathological processes resulting in neuronal cell injury in acute disorders and degenerative diseases of the brain (Paschen and Mengesdorf, 2005). Since viral infection induces both ER stress and interferon responses—viral double-stranded RNA intermediates trigger interferon responses and viral polypeptides synthesized during infection stimulate ER stress (He, 2006), PKR could participate in a complex interplay involving ER stress, viral infections and cellular antiviral responses. Which one of these PKR roles could be more relevant in relation with Alzheimer's disease is an open question.

*EIF2AK2* is located on chromosome 2p22-p21 and bears numerous SNPs. These were studied to select those of greater interest for a genetic association study, taking into account their potential functionality, their minor allele frequencies, and their linkage with other SNPs reported in the HapMap database. The SNP code rs2254958 (C/T) was finally selected. This SNP is located in the 5'-UTR region of the gene and, according to the Pupasview program for predicting potential functionality of genetic variations, it might modify the activity of an exonic splicing enhancer (see Conde et al., 2004 and the Web page: <http://pupasview.bioinfo.ocha.fib.es>). Interestingly, the C allele bears a highly conserved SRp55 binding enhancer element (GGCATC) (substitution of the polymorphism rs2254958 (underlined C) for T prevents binding (Cartegni et al., 2002, 2003)).

The *EIF2AK2* 5'-UTR SNP rs2254958 was therefore selected for a genetic association study in a Spanish case-control sample of AD. The study of a Canadian independent case-control sample, with pathological confirmation, was undertaken to validate the findings.

## 2. Subjects and methods

### 2.1. Patients and controls

The test sample consisted of 447 individuals from central Spain. These included 204 patients with sporadic AD (mean age at onset  $68.5 \pm 8.2$  years; 64% females) recruited at the neurology departments of the participating hospitals (see authors' institutions). The controls were 243 healthy individuals (mean age at examination  $69.1 \pm 9.9$  years; 60% females). All subjects gave their informed consent to be included in the study. All 'case' subjects had a diagnosis of probable AD according to the NINCDS-ADRA (McKhann et al., 1984) or DSMIV (Wilson and Skodol, 1994) criteria for Alzheimer's dementia. The control subjects underwent a Mini Mental test to confirm a minimum standard of cognitive ability (MMS score  $\geq 25$ ).

The Canadian independent case-control sample was composed of 93 patients with AD (mean age at onset  $69.3 \pm 9.7$  years; mean  $\pm$  S.D.; 62% females) and 134 controls (mean age at examination  $73.9 \pm 7.0$  years; 52% females). All these subjects underwent an autopsy at the London Health Sciences



Centre, University of Western Ontario. The criteria for AD included a diagnosis of dementia by a neurologist and an NIA/Reagan score showing a high probability that dementia was due to AD. The criteria for controls was a documented normal mental status (not necessarily recorded by a neurologist) on clinical exam prior to death, and an NIA/Reagan score showing a low probability of AD (Anon., 1997).

## 2.2. Genotyping

*EIF2AK2* 5'-UTR (rs2254958) was analyzed using an Applied Biosystems Custom TaqMan® SNP Genotyping Assay: forward primer CCA CAG GCA CGA CAA GCA TA, reverse primer CGA GTG ATA CCA GCG AAG ACT AAG, TaqMan MGB® probes [VIC/FAM] CGA GGC AT[C/T] GAG GTC, following the manufacturer's instructions. Both groups of subjects had previously been genotyped for *APOE* (Bullido et al., 2007).

## 2.3. Statistics

Genotypes and allele distributions were compared using the  $\chi^2$ -test. Logistic regression models, adjusted by age at AD onset, gender and sample origin, were used to calculate the strength of association between the genotypes and AD (expressed as the odds ratio [OR] and 95% confidence intervals [CI]). Survival studies using Kaplan–Meier analysis and Cox regression models were performed to calculate, respectively, the mean age at onset for each gene and genotype, and to estimate the strength of the effect of each variable on the age at onset. Together with the *APOE* and *EIF2AK2* genotypes, the Cox regression models included gender and sample origin as independent variables. All calculations were made using SPSS12.0 software.

## 3. Results

Table 1 shows the genotype distribution of the *EIF2AK2* gene in the two samples studied. Although the results were significant only in the Spanish subjects, in both samples the

C allele and the CC genotype were more common in AD patients than in controls: the OR (95% CI) for the C versus T allele were 1.33 (1.02–1.74) in the Spanish and 1.24 (0.85–1.81) in the Canadian sample (Table 1); for the CC versus TT genotype the OR were 1.81 (1.06–3.10) in the Spanish and 1.45 (0.68–3.06) in the Canadian sample (not shown).

Since the frequencies of the *EIF2AK2* genotypes were similar in the Spanish and Canadian cases and controls, the samples were combined into one to increase the statistical power of the analyses; however, all the analyses presented from this point on were undertaken with both the combined and separate samples. Both samples showed the same tendencies, although in most analyses the separate samples did not render significant results, most probably due to power issues (the power to detect the association of the C allele with AD with 95% confidence was 67%, 30% and 78% for the Spanish, Canadian and combined samples, respectively). For the logistic and Cox regression analyses using the combined sample, the sample origin was always included in the model as an independent categorical variable.

Table 2 shows the results of the logistic regression model used to assess the individual effect of the *EIF2AK2* and *APOE* genotypes in AD susceptibility; the age at onset, gender and origin of the sample were also included as independent variables. Both *EIF2AK2* and *APOE* contributed significantly to the model, although as expected the risk of AD attributable to *APOE* (OR for the carriers of the *APOE4* allele 3.56) was greater than that corresponding to *EIF2AK2* (OR for the CC genotype 1.61). It is worth noting here that the onset age also made a small but significant ( $p=0.01$ ) contribution to the model, leaving open the possibility of interactions between *EIF2AK2* and age with respect to AD. In light of these results, we next explored the possible interactions and/or confounding effects of *APOE* genotype, and of age at onset, on the association of *EIF2AK2* with AD.

Table 3 shows the distribution of the *EIF2AK2* genotypes in the combined sample stratified for *APOE*. In the individuals devoid of the *APOE4* allele, the frequency of the C allele was significantly increased in the patients (cases) (OR 1.36 [ $p=0.02$ ]) for the combined sample (Table 3). The same tendency was observed in the Spanish and Canadian samples analyzed individually (OR 1.34 and 1.55, respectively), although differences did not reach statistical significance

Table 1  
*EIF2AK2* genotypes distribution in two case–control AD samples

	<i>n</i> <sup>b</sup>	<i>EIF2AK2</i> (rs 2254958) <sup>a</sup>			OR <sup>c</sup>	$\chi^2$
		CC	CT	TT		
Spain						
Cases	204	73 (0.37)	98 (0.48)	33 (0.16)	1.33	0.03
Controls	243	75 (0.31)	110 (0.45)	59 (0.24)		
Canada						
Cases	93	38 (0.41)	39 (0.42)	16 (0.17)	1.24	0.27
Controls	134	46 (0.34)	60 (0.45)	28 (0.21)		

<sup>a</sup> Figures are numbers and, in parenthesis, the frequencies for the SNP identified by its dbSNP reference code.

<sup>b</sup> Number of individuals.

<sup>c</sup> Odds ratio for the C vs. T allele, plus the  $p$ -value obtained in the  $\chi^2$ -test.

Table 2  
Logistic regression model of the association of *EIF2AK2* and *APOE* with AD

	Relative risk (OR)	95% CI	$p$
<i>APOE</i> (any 4 vs. no. 4)	3.56	2.50–5.12	$2.7 \times 10^{-12}$
<i>EIF2AK2</i> (CC vs. TT)	1.61	1.02–2.55	0.04
<i>EIF2AK2</i> (CT vs. TT)	1.24	0.80–1.93	0.34 (ns)
Gender (female vs. male)	1.29	0.93–1.80	0.13 (ns)
Age at onset	0.98	0.96–0.99	0.01
Sample (Canada vs. Madrid)	1.05	0.75–1.49	0.77 (ns)

Figures are the estimated OR for the comparisons indicated at left, with the corresponding 95% confidence intervals and  $p$ -values.



Table 3  
*EIF2AK2* genotype distribution in the AD case-control combined sample stratified for *APOE*

<i>APOE</i> stratum	<i>EIF2AK2</i> genotype <sup>a</sup>			OR <sup>b</sup>	$\chi^2$ ; <i>p</i>
	CC	CT	TT		
Cases	72 (0.42)	70 (0.41)	30 (0.17)	1.36	0.02
Controls	105 (0.33)	134 (0.43)	75 (0.24)		
Any 4					
Cases	41 (0.33)	66 (0.53)	18 (0.14)	1.24	0.33 (ns)
Controls	16 (0.25)	36 (0.57)	11 (0.18)		

<sup>a</sup> Figures are numbers and, in parentheses, frequencies.

<sup>b</sup> Odds ratio for the C compared to T allele, with the *p*-value of the  $\chi^2$ -test.

(*p* = 0.08 and 0.1, respectively), most probably due to power issues (data not shown). In the *APOE4* carriers the differences were not significant, although it cannot be ruled out that this was due to the small number of individuals (especially of controls) in this group. These results, together with those of the previous logistic regression, strongly suggest that *EIF2AK2* is associated with AD independently of *APOE4*, and that it is even more important in the absence of *APOE4*.

Kaplan–Meier and Cox regression analyses were used to examine the relationship of *EIF2AK2* with the age at AD onset. Kaplan–Meier survival analysis was performed with the AD onset age as the dependent variable. The Spanish and Canadian samples were studied independently and combined, and the effect of *APOE4* analyzed by stratifying the samples according to *APOE* genotype (*APOE4* carriers and non-carriers). The Kaplan–Meier analysis showed an earlier age at onset for the *EIF2AK2* CC genotype compared with the CT and TT genotypes: In the combined sample, the age at onset  $\pm$  standard error of the mean was  $74.1 \pm 0.7$ ,  $76.1 \pm 0.57$  and  $77.1 \pm 0.9$  for the CC, CT and TT genotypes, respectively. This earlier onset associated with CC was more pronounced in the *APOE4* non-carriers ( $74.9 \pm 0.9$ ,  $78.1 \pm 0.7$  and  $78.2 \pm 0.96$ , respectively), whereas no signif-

icant effect was evident in the *APOE4* carriers ( $72.4 \pm 1.1$ ,  $72.3 \pm 0.9$  and  $74.3 \pm 1.6$ , respectively). The differences were statistically significant (*p* < 0.05) in the whole sample and in the *APOE4* non-carriers. The same results were obtained in the two samples analyzed independently (not shown), with differences being significant (*p* < 0.05) in the Spanish *APOE4* non-carriers.

Then a Cox regression survival model was used to assess the contribution of the *EIF2AK2* and *APOE* genotypes towards the age at onset. Since the Kaplan–Meier analyses showed that the *EIF2AK2* CT and TT genotypes were associated with similar survival, these two genotypes were taken together in the Cox regression analysis. The results of the latter (Table 4A) showed that, as widely reported in other samples, *APOE4* is associated with an earlier AD onset age. In addition, *EIF2AK2* contributed significantly to the model, although its effect was much less than that of *APOE4*.

Finally, a Cox regression analysis of the effect of *EIF2AK2* on age at AD onset in the *APOE4* non-carriers was performed. The results (Table 4B) indicated that, in individuals carrying no *APOE4* alleles, the *EIF2AK2* genotype is significantly associated with AD onset age.

Table 4  
 Cox regression model of the effect of *EIF2AK2* and *APOE* on AD onset age

Variable	B exponent	95% CI	<i>p</i>
(A) Whole sample			
<i>APOE</i> (any 4 vs. no. 4)	2.09	1.66–2.63	$5.6 \times 10^{-10}$
<i>EIF2AK2</i> (CC vs. any T)	1.29	1.02–1.64	0.03
Gender (female vs. male)	1.16	0.91–1.46	0.21 (ns)
Sample (Canada vs. Madrid)	0.72	0.57–0.93	0.01
(B) <i>APOE4</i> non-carriers			
<i>EIF2AK2</i> (CC vs. any T)	1.51	1.11–2.04	0.006
Gender (female vs. male)	1.28	0.94–1.76	0.10 (ns)
Sample (Canada vs. Madrid)	1.05	0.78–1.43	0.74 (ns)

The contribution of the indicated variables to the Cox regression model involving the combined Spanish–Canadian sample. The B exponent with its 95% confidence interval and *p*-value is shown.

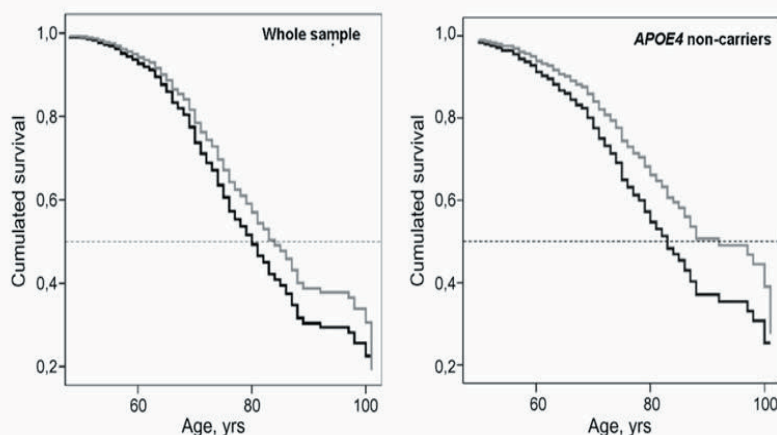


Fig. 1. AD onset age as a function of *EIF2AK2* genotype. Survival curves represent the frequency of individuals remaining as controls at the indicated ages according to the Cox regression model in the whole sample and in the *APOE4* non-carriers. Black lines, *EIF2AK2* CC genotype, grey lines *EIF2AK2* CT and TT (any T) genotypes; dotted horizontal lines indicate the 50% survival.

Please cite this article in press as: Bullido, M.J. et al., Double stranded RNA activated EIF2  $\alpha$  kinase (*EIF2AK2*; *PKR*) is associated with Alzheimer's disease, Neurobiol Aging (2007), doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.02.023



The survival curves obtained from the Cox regression models are shown in Fig. 1. It can be observed that, in the whole sample (left panel), the 50% survival occurred about 1.5 years earlier for the individuals with *EIF2AK2* CC genotype compared to the CT and TT (any T) genotypes, and that this difference was higher – about 3.3 years – in the *APOE4* non-carriers (right panel).

In summary, the different analyses performed suggest that the *EIF2AK2* C allele is associated with AD, the main manifestation of this association consisting of an earlier onset age in *EIF2AK2* CC homozygotes. This is more pronounced in individuals carrying no *APOE4* allele.

#### 4. Discussion

*APOE4* is the only universally accepted genetic risk factor for sporadic AD, but it is also universally accepted that other genes, probably many with small effects (Bertram and Tanzi, 2005), are associated with AD susceptibility. In addition, the interaction of genes with environmental factors is also widely accepted as being involved in the development of the disease. A growing body of evidence supports the possible involvement of infectious agents in AD pathogenesis. HSV-1 is a good candidate since (among other reasons) it is a highly prevalent virus found in latent form in human brains. Since the first epidemiological evidence of HSV-1's involvement in AD by Itzhaki et al. (1997) we have followed different approaches to test this hypothesis, and have reported supportive evidence from murine models and genetic epidemiological studies. We have also shown that, in a murine model of infection, HSV-1 entry into the brain via the hematogenous route is better facilitated by *APOE4* than *APOE3* (Burgos et al., 2003) and by higher doses of apoE (Burgos et al., 2002). In addition, we have recently reported that *TAP2*, which encodes one of the subunits of the transporter associated with antigen processing (TAP), is genetically associated with AD. Since the main mechanism used by HSV-1 to evade the human immune system is to block TAP, this result supports the interesting possibility of a link between the central nervous system's genetic susceptibility to viral infections and the onset of neurodegenerative disease. Further support for this has been offered by Lambert et al. (2000), who showed an association between LBP-1c/CP2/LSF and the risk of AD; this transcription factor is involved in the activation of human immunodeficiency and herpes simplex viruses.

The present work was intended to further explore the contribution of genes involved in different phases of the HSV-1 infection process to AD susceptibility. The interaction of *EIF2AK2* with the virus might regulate cell apoptosis/survival, thus providing an important virus–host cross-talk point in relation to neurodegeneration (He, 2006; Mohr, 2004). Further, PKR, the protein encoded by *EIF2AK2*, has previously been reported related to AD by histopathological studies (Onuki et al., 2004).

The *EIF2AK2* SNP analyzed in this work (db SNP 2254958) was found to be associated with AD. Homozygosity for the *EIF2AK2* C allele was more frequent in the cases, and was associated with around a 3.3-year earlier onset of the disease in individuals not carrying the *APOE4* allele. These observations were made in two case–control samples (one clinically and one autopsy-based) obtained independently from two countries, suggesting that the effect is observable over the noise caused by different population backgrounds and sampling designs, etc.

The active form of PKR is overexpressed in the brain of patients with AD (Chang et al., 2002; Onuki et al., 2004; Peel and Bredesen, 2003), although whether this is an early event in the disease process or a late consequence of neurodegeneration is not clearly established. However, when PKR is activated by a viral infection or by other means—it is worth noting here that PKR is activated in the brain of mice overexpressing mutant APP (Peel, 2004; Peel and Bredesen, 2003), this activation initiates a pathway leading to cell death in several cell types including human neuroblastoma (Onuki et al., 2004), although cell death induced by PKR has not been proven in brain “in vivo”.

It is therefore plausible that PKR actively participates in the neurodegeneration process. Nevertheless, the mechanisms mediating the potential PKR involvement in neurodegeneration deserve further studies. In this sense, it should be mentioned that PKR mediated EIF2a phosphorylation, which leads to a blocking of viral protein synthesis following infections is, although very important, not the only relevant function of this protein (see a review in Garcia et al., 2006); in relation with viral infections, PKR also regulates the expression of viral stress induced genes, and it is an essential component of the IFN mediated cellular antiviral response (He, 2006). Apart from its role in antiviral responses, PKR is a component of several signal transduction pathways initiated by cytokines, growth factors or extracellular stress inducers; remarkably, PKR appears as a major mediator of ER stress in a human neuroblastoma cell line (Onuki et al., 2004). Although the inducers and the phosphorylation targets of PKR in these pathways remain to be determined, it seems that the human protein PACT is a major mediator of cell response to several extracellular stress inducers (Li et al., 2006). Thus, although PKR is very important in antiviral response, it cannot not be ruled out that the association with AD which we observe in the present work is due to its role in other functions altered in AD patients.

With respect to the potential effect of SNP rs2254958 in *EIF2AK2* (PKR) functionality, it should be mentioned that: (i) it is located within a highly conserved exonic splicing element: the sequence (GGCATC) is the consensus site for the binding of the regulatory protein SRp55 (bonding is disrupted when the underlined C-SNP rs2254958—is replaced by T); it therefore probably influences gene expression/splicing (Cartegni et al., 2002); (ii) it is in strong linkage disequilibrium with other SNPs which might also be responsible for the association with AD; in this regard, we also genotyped



in the Spanish sample the intronic SNP rs4648174 which, as predicted from the HapMap data, was in almost complete disequilibrium (data not shown) with the SNP rs2254958 studied here; (iii) the proximal promoter SNPs of *EIF2AK2* are associated with the natural outcome of hepatitis C viral infection in humans, possibly by their effect on *EIF2AK2* expression (Knapp et al., 2003), although the linkage of these promoter SNPs with the 5'-UTR SNP rs2254958 has not yet been studied.

In summary, the present results suggest that *EIF2AK2* is associated with AD, the CC genotype of the 5'-UTR SNP rs2254958 being associated with the possibility of developing AD at an earlier age, especially in persons who are non-carriers of *APOE4*. They also further support the possibility of a link between the central nervous system's genetic susceptibility to viral infections and the onset of neurodegenerative disease.

#### Disclosure statement

All the authors declare they have no current or potential conflicts of interest.

#### Acknowledgements

This work was supported by Obra Social Caja de Madrid, Comunidad Autónoma de Madrid (GR/SAL/0783/2004), Ministerio de Educación y Ciencia (GEN2003-20235-C05-05 and SAF2004-07656-C02), and Ministerio de Sanidad y Consumo (Instituto de Salud Carlos III; RTIC C03/07 and RTIC C03/06). The institutional grant awarded by the Fundación Ramón Areces to the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa is gratefully acknowledged. We thank Drs. Pedro Gil (Hospital Clínico de San Carlos, Madrid, Spain), Francisco Coria (Hospital Universitario Son Dureta, Palma de Mallorca, Spain), and Vladimir Hachinski (University of Western Ontario, London, Canada) for their generous contribution by providing AD cases and controls, and to the Asociación de Familiares de Alzheimer de Madrid (AFAL) for continuous encouragement and help. This work was made possible by the generous participation of the patients, the controls and their families.

#### References

- Anon., 1997. Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer's disease. The National Institute on Aging, and Reagan Institute Working Group on Diagnostic Criteria for the Neuropathological Assessment of Alzheimer's Disease. *Neurobiol Aging* 18 (4 Suppl.), S1–S2.
- Bauer, D., Tampe, R., 2002. Herpes viral proteins blocking the transporter associated with antigen processing TAP—from genes to function and structure. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 269, 87–99.
- Bertram, L., Tanzi, R.E., 2005. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J. Clin. Invest.* 115 (6), 1449–1457.
- Bullido, M.J., Artiga, M.J., Recuero, M., Sastre, I., Garcia, M.A., Aldudo, J., Lendon, C., Han, S.W., Morris, J.C., Frank, A., Vazquez, J., Goate, A., Valdivieso, F., 1998. A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia. *Nat. Genet.* 18 (1), 69–71.
- Bullido, M.J., Martinez-Garcia, A., Artiga, M.J., Aldudo, J., Sastre, I., Gil, P., Coria, F., Munoz, D.G., Hachinski, V., Frank, A., Valdivieso, F., 2007. A TAP2 genotype associated with Alzheimer's disease in APOE4 carriers. *Neurobiol. Aging* 28 (4), 519–523.
- Burgos, J.S., Ramirez, C., Sastre, I., Bullido, M.J., Valdivieso, F., 2002. Involvement of apolipoprotein E in the hematogenous route of herpes simplex virus type 1 to the central nervous system. *J. Virol.* 76 (23), 12394–12398.
- Burgos, J.S., Ramirez, C., Sastre, I., Bullido, M.J., Valdivieso, F., 2003. ApoE4 is more efficient than E3 in brain access by herpes simplex virus type 1. *Neuroreport* 14 (14), 1825–1827.
- Cartegni, L., Chew, S.L., Krainer, A.R., 2002. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat. Rev. Genet.* 3 (4), 285–298.
- Cartegni, L., Wang, J., Zhu, Z., Zhang, M.Q., Krainer, A.R., 2003. ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res.* 31 (13), 3568–3571.
- Conde, L., Vaquerizas, J.M., Santoyo, J., Al-Shahrour, F., Ruiz-Llorente, S., Robledo, M., Dopazo, J., 2004. PupaSNP Finder: a web tool for finding SNPs with putative effect at transcriptional level. *Nucleic Acids Res.* 32 (Web Server issue), W242–W248.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261 (5123), 921–923.
- Chang, R.C., Wong, A.K., Ng, H.K., Hugon, J., 2002. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha (eIF2alpha) is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 13 (18), 2429–2432.
- Fratiglioni, L., De Ronchi, D., Aguero-Torres, H., 1999. Worldwide prevalence and incidence of dementia. *Drugs Aging* 15 (5), 365–375.
- Garcia, M.A., Gil, J., Ventoso, I., Guerra, S., Domingo, E., Rivas, C., Esteban, M., 2006. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70 (4), 1032–1060.
- He, B., 2006. Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses. *Cell Death Differ.* 13 (3), 393–403.
- Itzhaki, R.F., Lin, W.R., Shang, D., Wilcock, G.K., Faragher, B., Jamieson, G.A., 1997. Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease. *Lancet* 349 (9047), 241–244.
- Itzhaki, R.F., Wozniak, M.A., 2006. Herpes simplex virus type 1, apolipoprotein E, and cholesterol: a dangerous liaison in Alzheimer's disease and other disorders. *Prog. Lipid Res.* 45 (1), 73–90.
- Knapp, S., Yee, L.J., Frodsham, A.J., Hennig, B.J., Hellier, S., Zhang, L., Wright, M., Chiaramonte, M., Graves, M., Thomas, H.C., Hill, A.V., Thursz, M.R., 2003. Polymorphisms in interferon-induced genes and the outcome of hepatitis C virus infection: roles of MxA, OAS-1 and PKR. *Genes Immun.* 4 (6), 411–419.
- Lambert, J.C., Goumidi, L., Vrieze, F.W., Frigard, B., Harris, J.M., Cummings, A., Coates, J., Pasquier, F., Cottel, D., Gaillac, M., St. Clair, D., Mann, D.M., Hardy, J., Lendon, C.L., Amouyel, P., Chartier-Harlin, M.C., 2000. The transcriptional factor LBP-1c/CP2/LSF gene on chromosome 12 is a genetic determinant of Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 9 (15), 2275–2280.
- Li, S., Peters, G.A., Ding, K., Zhang, X., Qin, J., Sen, G.C., 2006. Molecular basis for PKR activation by PACT or dsRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (26), 10005–10010.
- McCluskey, J., Rossjohn, J., Purcell, A.W., 2004. TAP genes and immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 16 (5), 651–659.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., Stadlan, E.M., 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of

- the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34 (7), 939–944.
- Mohr, I., 2004. Neutralizing innate host defenses to control viral translation in HSV-1 infected cells. *Int. Rev. Immunol.* 23 (1–2), 199–220.
- Onuki, R., Bando, Y., Suyama, E., Katayama, T., Kawasaki, H., Baba, T., Tohyama, M., Taira, K., 2004. An RNA-dependent protein kinase is involved in tunicamycin-induced apoptosis and Alzheimer's disease. *EMBO J.* 23 (4), 959–968.
- Paschen, W., Mengesdorf, T., 2005. Endoplasmic reticulum stress response and neurodegeneration. *Cell Calcium* 38 (3–4), 409–415.
- Peel, A.L., 2004. PKR activation in neurodegenerative disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63 (2), 97–105.
- Peel, A.L., Bredesen, D.E., 2003. Activation of the cell stress kinase PKR in Alzheimer's disease and human amyloid precursor protein transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* 14 (1), 52–62.
- Wilson, H.S., Skodol, A., 1994. Special report: DSM-IV: overview and examination of major changes. *Arch. Psychiatr. Nurs.* 8 (6), 340–347.

